

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program Biochemie

Studijní obor Biochemie



Pavel Novotný

**Příprava expresních vektorů pro produkci fúzního proteinu NS2-NS3 virů**  
**Zika a Dengue**

Preparation of the expression vectors for the production of fusion protein NS2-NS3  
of Dengue and Zika viruses

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2018

**Charles University**  
**Faculty of Science**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za rady ohledně této práce, dále také Tat'áně Majerové, PhD. za trpělivost při konzultacích a všem ostatním členům Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za příjemné pracovní prostředí. Děkuji také všem ostatním mimo akademickou sféru za podporu.

## Abstrakt

Viry Zika a Dengue, náležející do rodiny *Flaviridae*, způsobují horečnatá onemocnění. Infekce může být bezpříznaková či s příznaky lehké virózy, nicméně se může rozvinout až po život ohrožující komplikace. V případě Dengue může nemoc přerůst až do hemorrahgické horečky. Infekce virem Zika je také nebezpečná pro těhotné ženy kvůli zvýšenému riziku výskytu mikrocefalie u novorozenců. Tyto viry jsou přenášeny komáry rodu *Aedes*, řadí se tak mezi arboviry. Pro boj s těmito chorobami je vhodná vakcinace, zároveň ale probíhá vývoj virostatik. Inhibitory virových proteas jsou důležitými klinicky schválenými virostatiky proti HCV a HIV. Zda by vhodným cílem nových léčiv mohly být i proteasy virů Dengue nebo Zika není zatím zcela zřejmé, nicméně tyto proteasy jsou velmi zajímavé i z pohledu základního výzkumu. Flavivirová proteasa se nachází v polyproteinu syntetizovaném aparátem hostitelské buňky, a to v doméně NS3. Tento enzym potřebuje aktivační doménu NS2B, mechanismus interakce však není zcela prostudován. NS3 je multidoménový enzym, kromě proteasové aktivity vykazuje ještě aktivitu NTPasovou, helikasovou a RNA 5'-trifosfatasovou. Není zřejmé, proč tyto enzymy koexistují v jedné proteinové doméně. Abychom mohli odpovědět na některé tyto otázky, je vhodné připravit expresní systémy pro zkoumání enzymové kinetiky a dalších strukturních a funkčních vlastností tohoto proteinu.

Předkládaná práce popisuje klonování různých variant expresních systémů pro produkci Zika a Dengue proteasy v *E. coli*, ukazuje jejich úspěšnou bakteriální expresi a na příkladu jednoho vybraného proteinu navrhuje možný purifikační postup.

## Abstract in English

Zika and Dengue viruses, which are part of *Flaviridae* family, are responsible for fever diseases. Infection can be asymptomatic or with symptoms of light virosis, however, it could be also life threatening. In the case of Dengue, it could progress to haemorrhagic fever. Infection by Zika is also dangerous for pregnant women because of enhanced risk of microcephaly in new-borns. These viruses are transferred by mosquitoes from *Aedes* family and are part of arbovirus group. Vaccination is a good tool for control of these diseases, but development of virostatics are also in progress. Inhibitors of viral proteases are important clinically approved virostatics against HIV and HCV. It is not clear, if Zika or Dengue proteases can become drug targets, however these proteases are also interesting for basic research. Flavivirus protease is located in viral polyprotein synthesized by host cells as a part of NS3 domain. This enzyme needs activation domain NS2B; mechanism of this interaction is not fully understood. On top of the protease activity, NS3 domain includes helicase, NTPase and RNA 5'-triphosphatase activity. It is not known why these enzymes coexist as one protein domain. To address these unanswered questions, it is important to prepare expression systems for kinetic, structure and function analysis of the NS3 protease.

This study reports cloning of expression systems for production of Zika and Dengue proteases in *E. coli* and their successful expression. A possible purification strategy is suggested on an example of one protein variant.

(In Czech)

## Obsah

1	Úvod .....	1
1.1	Flaviviry.....	1
1.2	Arboviry .....	4
1.3	Rozšíření .....	4
1.4	Virová proteasa a helikasa .....	8
2	Cíl práce.....	13
3	Metody.....	14
3.1	Polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction) .....	14
3.2	Elektroforéza.....	15
3.3	Čištění DNA.....	16
3.4	Restrikční štěpení.....	17
3.5	Vytvoření tupých konců linearizovaného vektoru (z. angl. blunting) .....	17
3.6	Ligace.....	18
3.7	Určování koncentrace DNA, proteinů .....	18
3.8	Sekvenace.....	18
3.9	Transformace vektoru do bakterií.....	18
3.10	Měření optické hustoty.....	19
3.11	Western blot .....	19
3.12	Izolace proteinů.....	20
4	Použité chemikálie, sady a přístroje .....	22
5	Výsledky.....	24
5.1	Klonování rekombinantních proteinů .....	24
5.2	Připravené expresní systémy pro fúzní proteiny .....	26
5.3	Exprese variant fúzních proteinů .....	28

5.4	Návrh purifikačního postupu.....	31
6	Diskuze .....	35
7	Závěr .....	37
	Literatura: .....	38
	Přílohy (5 stran):.....	40

## Seznam zkratek:

ADE	posílení infekitivity protilátkami (z angl. antibody-dependent enhancement)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulphate)
C	kapsida (z angl. capsid)
DENV-N	Dengue virus (N=1-4 podle sérotypu)
DTT	dithiothreitol
E	virový obal (z angl. envelope)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FPLC	kapalinová chromatografie k rychlému čištění proteinů (z angl. fast protein liquid chromatography)
HCV	Virus hepatitidy C
Hfil	Varianta fúzního proteinu obsahující hydrofilní NS2B aminokyselinovou sekvenci
Hfob	Varianta fúzního proteinu obsahující hydrofilní a hydrofobní NS2B aminokyselinovou sekvenci
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
kb	kilo báze
M	membrána
MBP	protein vázající maltosu (z angl. maltose binding protein)
MVEV	Virus encefalitidy Murray Valley
MW	molekulová hmotnost (z angl. molecular weight)
NiNTA	nikl-nitrilotrisacetát
NS	nestrukturní protein



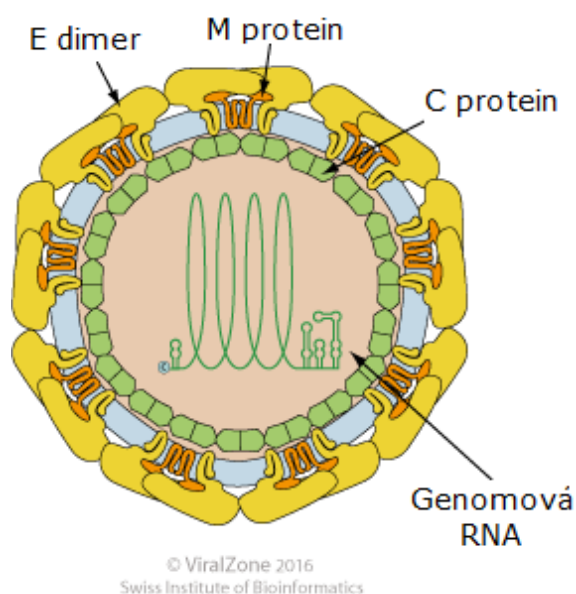
NS3hel	helikasová doména nestrukturního proteinu 3
NS3pro	proteasová doména nestrukturního proteinu 3
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PVDF	polyvinylidendifluorid
SDS	dodecylsíran sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
ssRNA	jednovláknová RNA (z angl. single strand ribonucleic acid)
TAE	pufr obsahující tris, kyselinu octovou a EDTA (z angl. tris-acetate-EDTA)
TEV	virus leptané mozaiky tabáku (z angl. Tobacco etch virus)
TBS	pufr obsahující 50 mM tris a 150 mM NaCl (z angl. tris-buffered saline)
TEMED	tetramethylethylendiamin
ZIKV	Zika virus

# 1 Úvod

## 1.1 Flaviviry

### 1.1.1 Stavba virové částice

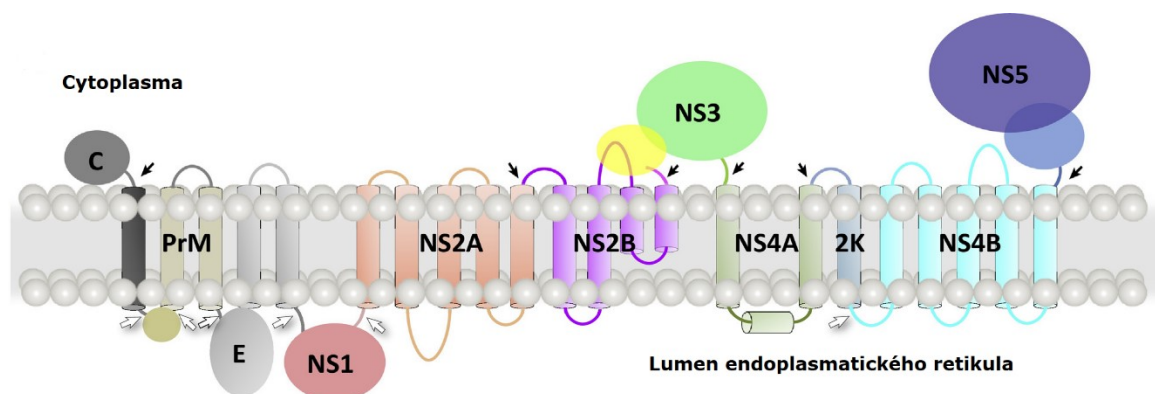
Flaviviry (lat. *Flaviviridae*) patří mezi obalené RNA viry nesoucí jednovláknovou (angl. single strand, ss) pozitivní RNA (ss +RNA). Jejich velikost je od 40 nm do 60 nm, čímž se řadí spíše mezi menší viry [1]. Virové částice obsahují amfifilní kapsidový protein C (z angl. capsid) tvořící bílkovinné pouzdro, jehož hydrofilní část (kladně nabitá) interaguje se záporně nabitou genomovou RNA viru. Vnější, hydrofobní část virové kapsidy je pak obalena hostitelskou membránou (lipidovou dvojvrstvou, z čehož plyne klasifikace obalené viry). Samotná kapsida je neuspořádaná, což je ve srovnání s ostatními rodinami virů spíše výjimečné [2]. Pro adhezi virové částice na hostitelskou buňku je důležitý obálkový glykoprotein E (z angl. envelope) ukotvený v membráně pomocí transmembránového glykoproteinu M (z angl. membrane). RNA viru může posloužit jako matrice pro syntézu proteinů. V případě flavivirů je však toto vlákno přepsáno transkripčním systémem hostitelské buňky na komplementární, které pak slouží jako templát pro syntézu mRNA [3]. Schéma virové částice je na obr. 1.



Obr. 1: Virová částice rodiny *Flaviviridae* (přeloženo). V membráně, původem z hostitelské buňky (modře) je zakotvený membránový M protein (červeně) vázající obalový E protein ve formě dimeru (žluté). Kapsida je tvořena C proteinem (zelená), vnitřek částice obsahuje genomovou ss +RNA (zelené vlákno) (převzato a upraveno dle [4]).

### 1.1.2 Životní cyklus virů

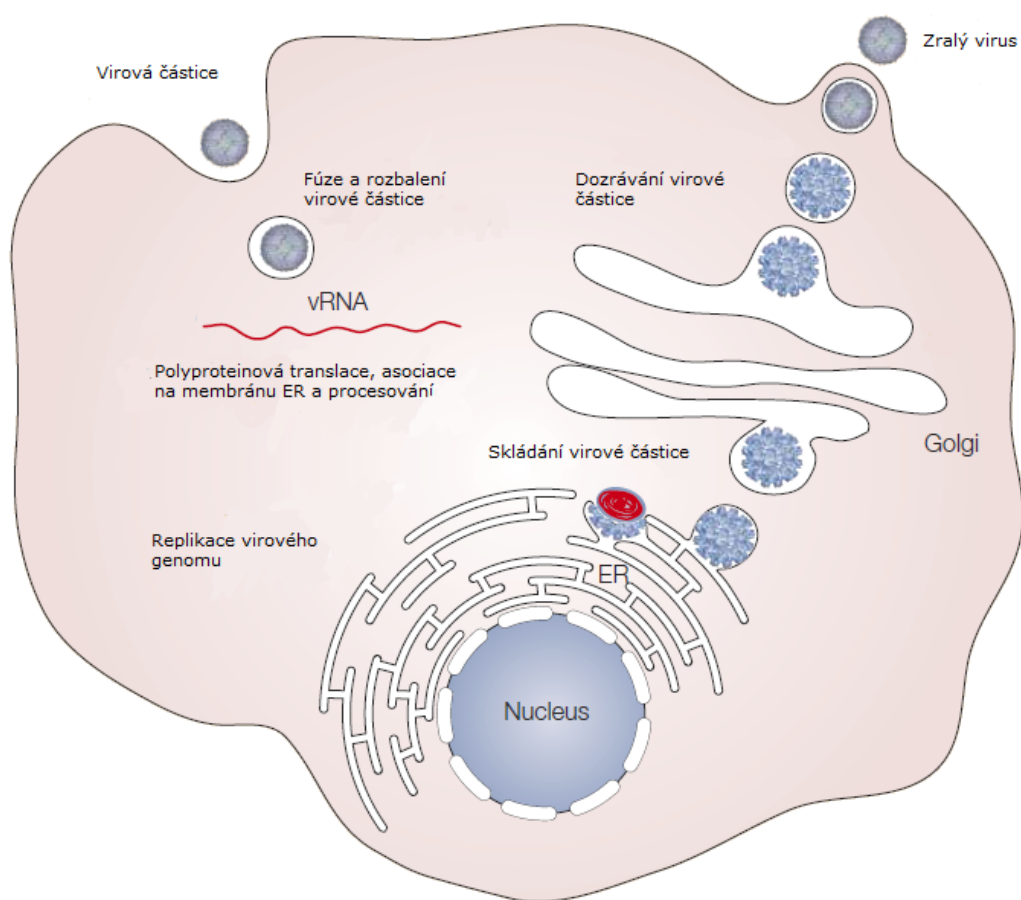
Virus vniká do hostitelské buňky endocytózou zprostředkovanou buněčnými receptory. Ty reagují na glykoproteiny na povrchu virové částice a iniciují vznik endozomu uspořádáním klathrinových molekul kolem membrány [3]. Kyselé prostředí endozomu způsobí přestavbu dimeru E proteinu na trimer, což vede k membránové fúzi, rozbalení částice a vyplavení virové RNA do cytosolu [3]. Transkript této původní RNA slouží jako templát pro syntézu mRNA, která je následně translatována aparátem hostitelské buňky na polyprotein. Ten je zakotven v membráně endoplasmatického retikula (ER) hostitelské buňky na základě signalizačních sekvencí hydrofobních domén [5] (schematické znázornění zakotveného polyproteinu je na obr. 2). Polyprotein je následně štěpen virovou proteasou na vnější (cytoplazmatické) straně ER a hostitelskými proteasami v lumen ER. Vzniknou tak tři strukturní proteiny, prM (podle anglického pre-membrane), C a E, a dále pak sedm nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) [2]. Tyto se vyznačují enzymovými aktivitami, nalezneme mezi nimi serinovou proteasu, RNA helikasu, RNA dependentní RNA polymerasu nebo aktivační kofaktory pro enzymovou katalýzu.



Obr. 2: Schematicky zobrazená organizace polyproteinu flaviviru v membráně endoplasmatického retikula. Obrázek zobrazuje domnělé rozmístění v membráně, kdy je polyprotein zpracováván buněčnými (bílé šipky) a virovými (černé šipky) proteasami. Zeleně je zvýrazněn protein NS3 obsahující proteasu a helikasu, aktivační protein NS2B je označen fialově. (převzato a upraveno dle [6])

Po sestřihu proteasami je C protein a virová RNA v cytoplasmě, E protein v lumen ER, kde tvoří komplex s prM. Vzniká nezralá částice, která je následně transportována skrze

Golgiho aparát. Nízké pH v této organelle způsobuje přeuspořádání glykoproteinu prM a jeho sestřih zprostředkovaný hostitelskou proteasou furin, virion dozrává a je exocytoticky vyloučen z hostitelské buňky [3]. Proces skládání a dozrávání virové částice nemusí být vždy efektivní. Vznikají i subvirové částice, které jsou menší (cca 30 nm), neinfekční a obsahují pouze proteiny E a M asociované na lipidovou dvojvrstvu, virová genetická informace v podobě RNA v těchto částicích chybí [5]. Celý životní cyklus flavivirů je znázorněn na obr. 3.



Obr. 3: Životní cyklus flaviviru. Virová částice se endocytózou dostává do hostitelské buňky, kde je rozbalena a vyplavuje se RNA. Její transkript slouží jako templát pro mRNA, dle které se syntetizují virové proteiny ve formě polyproteinu. Ten je asociován s membránou endoplasmatického retikula, kde je štěpen virovými a hostitelskými proteasami. Nezralá částice je transportována do Golgiho aparátu. Zde působí proteasa furin na prM protein, čímž vzniká zralá částice, která je exocytózou vyloučena z buňky (převzato a upraveno dle [5]).

## 1.2 Arboviry

Arboviry jsou viry přenášené členovci (z lat. *arthropoda*). Je známo okolo 130 arbovirů patřících do 12 virových rodin, jednou z nich je právě i rodina *Flaviviridae*.

Většina flavivirů má jako konečného hostitele člověka. Vektorem (přenašečem) mohou být klíšťata, komáři nebo mouchy rodu *Phlebotomus* [7]. Přenašeči parazitují na lidské krvi, kterou se částice viru dostávají do organismu. Flaviviry jsou původci řady nemocí, zahrnují West Nile virus, Dengue virus, virus žluté zimnice, virus Zika. Důležitou skupinu tvoří viry způsobující encefalitidy, kde jsou přenašeči většinou klíšťata [8].

Významnou skupinou přenašečů je rod komárů *Aedes*. Zástupci tohoto rodu se vyskytují v tropických a subtropických oblastech, největší riziko nákazy je v obydlených oblastech a v blízkosti vodních zdrojů [9]. Jelikož vývoj vakcín ještě není u konce, nabízí se možnost zabránění hromadné nákazy omezením lidského kontaktu s přenašeči virových nemocí. Snížení počtu komárů lze docílit klasickou cestou pomocí insekticidů nebo s využitím genovou manipulací, např. využitím CRISPR/Cas9 technologie. Tou se vytvoří geneticky modifikovaná populace, jejímž křížením s volně žijícími komáři vznikne neplodná generace [10], [11]. Potomstvo vzešlé z křížení umírá mladé, pokud není podáno v přírodě se běžně nevyskytující antidotum (tetracyklin), čehož se využívá při produkci těchto jedinců [12]. K udržení nízké populace komárů je však třeba dodávat stále nové GMO jedince, snížení rizika nákazy tedy může po vysazení této metody znovu narůst. Tato metoda byla již použita na Floridě. Navzdory všem obavám ústav US Food a Drug Administration's Center for Veterinary Medicine deklaroval nepostřehnutelný dopad na životní prostředí [13]. Proto se metoda aplikovala i v Brazílii, Indii a dalších místech se zvýšeným rizikem nákazy arboviry [12]. Další možností, jak snížit populaci komárů a tím i riziko nákazy, je skrze bakterii *Wolbachia*. Komáři infikovaní touto bakterií jsou buď neplodní, nebo nejsou schopni nakazit konečného hostitele [14].

## 1.3 Rozšíření

Nemoc způsobená virem Zika byla poprvé popsána u lidí v Nigerii roku 1954 [15]. Projevy jsou popsány jako horečky, bolesti hlavy, bolesti kloubů nebo žloutenka.

Samotný virus byl izolován z komára *Aedes africanus*. Virus z Afriky migroval do Asie, cestou přes Malajsii a Mikronésii se v roce 2014 zanesl do Brazílie, kde se pravděpodobně rozšířil během soutěže Va'a World Sprint Championship, které se zúčastnily čtyři země zasažené virem Zika [16]. S rozšířením viru se začala také ukazovat souvislost mezi nákazou a zvyšujícím se počtem novorozenců s mikrocefalií, mechanismus účinku na mozek je nejspíše spjat s imunitní odpovědí na nesbalené proteiny [17]. V šedé kůře mozkové dochází též po infekci k vyšší expresi kaspasy 3 a tudíž k apoptose nervových buněk [18]. Další možný mechanismus je skrze virové proteiny NS4A a NS4B, které stimulují autofagii prostřednictvím dráhy Akt-mTOR [19]. Tou hostitelská buňka reguluje své organely a buněčný cyklus, inhibice této dráhy v mozkových buňkách může vést právě k mikrocefalii [20].

Virus Dengue byl objeven už ve čtyřicátých letech minulého století, první větší popsany výskyt je však datován v roce 1963 v Kalkatě [21]. Tento virus způsobuje horečnaté onemocnění, které se nejprve projevuje sníženou chutí k jídlu, horečkou, bolestí hlavy, kloubů nebo svalů, v akutní fázi krvavými skvrnami pod kůží, vyrážkou a zhoršenými prvotními symptomy. Ty se mohou rozvinout do život ohrožující formy, tzv. hemorrahgické horečky Dengue. Mechanismus infekce je vysvětlován napadením a aktivací monocytů [22] a následnou zvýšenou produkcí cytokinů vedoucí až do stavu cytokinové bouře [23]. Tato skutečnost může vést, podobně jako u nákazy virem Zika, až k poškození vyvíjejícího se mozku [24]. Existují celkem čtyři sérotypy viru Dengue. Infekce jedním sérotypem zanechává doživotní imunitu, ale pouze ke stejnému sérotypu. Nemoc způsobená jiným sérotypem probíhá u již imunizovaných jedinců hůře [25]. Je to zaviněno paměťovými B-lymfocyty produkujícími protilátky proti prvnímu, již nepřítomnému, sérotypu. Tyto lymfocyty jsou aktivovány druhým, pro tělo ještě neznámým sérotypem, což vede k produkci protilátek. Produkované protilátky jsou však proti druhému sérotypu neúčinné, zároveň ale zabraňují aktivaci nediferencovaných B-lymfocytů, které by vytvořily nové imunoglobuliny schopné vázat virové částice druhého sérotypu (tento jev se označuje zkratkou ADE – z angl. antibody dependent enhancement) [26].

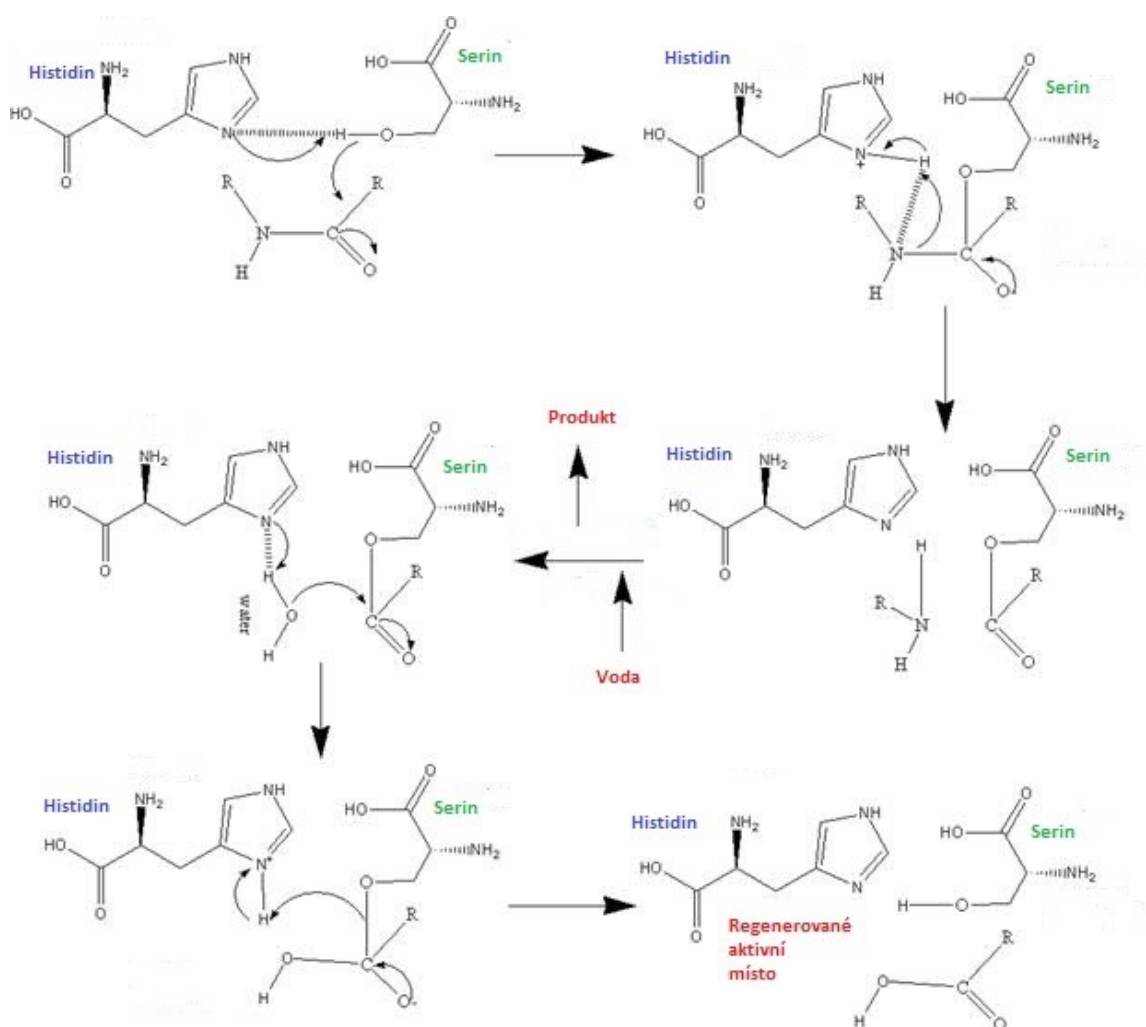
Epidemie horečky Dengue se šířila skrze celou jihovýchodní Asii, pronikla i do Afriky a Ameriky. V roce 1997 byl virus rozšířen celosvětově v tropických oblastech, odhadovaný nárůst je 100 milionů případů projevu horečky Dengue ročně [27]. Případy nákazy se objevují i v Evropě, v roce 2013 bylo nakaženo téměř 80 lidí vracejících se do Evropy z ostrova Madeira [28].

Viry Zika a Dengue jsou přenášeny infikovanými komáry rodu *Aedes*, hlavně druhy *aegypti* (původem z Afriky) a *albopictus* (původně se vyskytující v jihovýchodní Asii) [29]. Do Ameriky se dostal druh *Aedes aegypti* pravděpodobně na lodích z Afriky v 17. století a skrze něj i virus Dengue [30]. Vyskytuje se, jak již bylo řečeno, v tropických a subtropických oblastech, kde je největší riziko nákazy.

Vzhledem k existenci čtyř sérotypů viru Dengue je vývoj vakcíny i případného léčiva ztížený, případné léky musí počítat se všemi typy viru. Současná tetravalentní vakcína CYD-TVD však vykazuje malou účinnost proti sérotypu 2 [31], který ale statisticky nejvýznamněji stojí za nejhoršími projevy nemoci (hemorrhagickou horečkou) [32]. Vývoj vakcíny pro imunizaci proti viru Zika v současnosti probíhá také [33], [34], zároveň jsou také snahy připravit léčiva proti oběma typům horečky [35], [36]. Jak známe z historie vývoje virostatik proti HIV a HCV, dobrými léky jsou inhibitory virových proteas, po zavedení se staly komerčně úspěšnými (simeprevir, asunaprevir, boceprevir, paritaprevir, telaprevir, vaniprevir, a grazoprevir jako inhibitory HCV proteasy [37]). Proteasa je důležitá při maturaci virové částice, štěpí totiž polyprotein syntetizovaný hostitelskou buňkou na jednotlivé funkční proteiny, které se poté mohou složit do tvaru virové částice. Ty po dozrání v Golgiho aparátu a následné endocytóze infikují nové buňky [38]. Tento mechanismus je zachován u všech flavivirů. Flavivirové proteasy jsou však zajímavé nejen z medicínálního, ale i z biochemického hlediska: proteasa je součástí vícedoménového proteinu NS3 společně s helikasou a pro správné sbalení a funkci potřebují oba enzymy aktivační peptid, který s nimi nekovalentně interaguje [39].

Proteasy se obecně liší stavbou aktivního centra. Serinové proteasy využívají k hydrolýze peptidů triádu serinu (obsahuje nukleofilní atom kyslíku), histidinu a asparagové kyseliny (stabilizují substrát vodíkovými můstky, histidin navíc funguje jako donor protonu na aminoskupinu rozštěpeného peptidu). Mezi takové proteasy patří například

chymotrypsin nebo právě flavivirové proteasy. Mechanismus štěpení je znázorněn na obrázku 4. Podobně se definují cysteinové proteasy, kde však roli serinu hraje cystein. Mezi cysteinové proteasy řadíme například rodinu proteas důležitých pro apoptosu označovanou jako kaspasy. Obě zmíněné skupiny enzymů jsou si podobné mechanismem, kdy tvoří kovalentní vazbu se substrátem během jeho štěpení. Aspartátové proteasy (katalytické místo je tvořené dvěma asparagovými kyselinami a donorem elektronu serinem nebo threoninem – např. HIV proteasa, pepsin) nebo metaloproteasy (v aktivním centru kovový kationt, obvykle zinečnatý – např. kolagenasa) naopak využívají nekovalentních interakcí (vodíkové vazby, iontové interakce) [40].



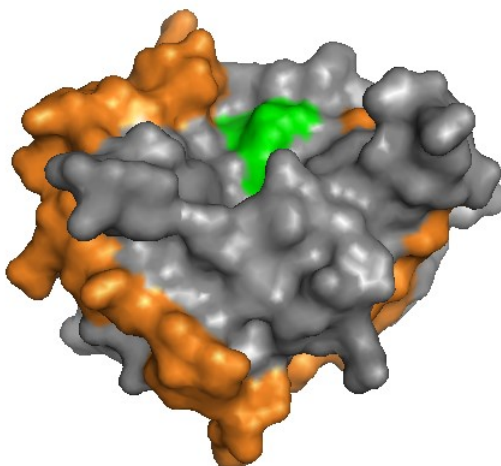
Obr. 4: Mechanismus štěpení peptidů serinovými proteasami. Histidin interaguje se serinovou alkoholovou skupinou, odebírá jí proton a vytváří tak silně nukleofilní alkoxidový ion. Ten atakuje atom uhlíku z peptidové vazby a vytváří tetragonální intermediát. Vzniklý negativně nabitý kyslík je nestabilní a tvoří dvojnou vazbu za rozštěpení vazby mezi karbonylovou a aminovou skupinou. Ta je protonována a celý produkt je v aktivním centru nahrazen vodou (vodíková vazba histidinového dusíku a vodíku z molekuly vody), jejíž kyslík nukleofilně



atakuje uhlík intermediátu. Vzniká tetragonální intermediát, jehož odštěpením se regeneruje aktivní místo a vzniká druhý produkt reakce (převzato a upraveno dle [41]).

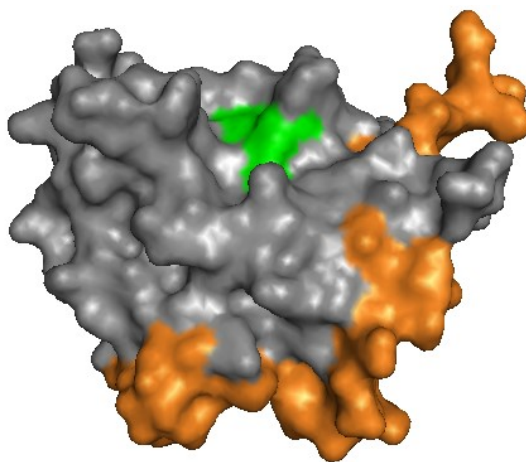
## 1.4 Virová proteasa a helikasa

Proteasy viru Zika a Dengue patří mezi serinové proteasy s terciální strukturou podobnou chymotrypsinu, sestávají z proteinu NS3 s katalytickou triádou Ser<sup>135</sup>-His<sup>51</sup>-Asp<sup>75</sup> a z membránově vázaného aktivačního peptidu NS2B. Struktura proteasy s navázaným inhibitorem je na obrázku 5.



Obr. 5: Krystalová struktura komplexu NS2B-NS3<sup>pro</sup>, PDB kód 5H6V. Vytvořeno pomocí programu PyMol [42]. Šedá barva značí NS3 proteasovou doménu, oranžová NS2B. Katalytická triáda je v zelené barvě. Tento model byl získán ve vazbě s dipeptidovým inhibitorem.

Proteasa Dengue je podobná protease Zika, aktivní centrum tvoří také Ser<sup>135</sup>-His<sup>51</sup>-Asp<sup>75</sup> a ke správné funkci potřebuje NS2B protein, který indukce sbalení do správné konformace [43]. Lze ji exprimovat v bakteriích, jelikož nevyžaduje posttranslační modifikace a neobsahuje disulfidické můstky [39]. Krystalová struktura je zobrazena na obr. 6. Existují odchylky v rozeznávaných štěpných místech viru Dengue v závislosti na sérotypu. Důležitá štěpná místa včetně jejich pozic v polyproteinu všech známých sérotypů viru Dengue a Zika jsou uvedeny v tabulce 1.



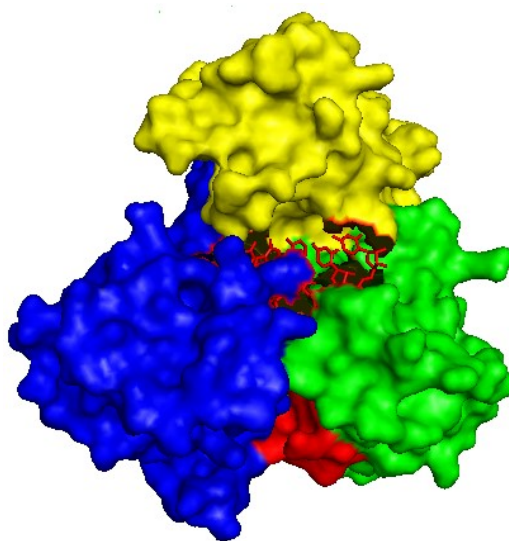
Obr. 6: Terciární struktura dengue proteasy sérotypu 2, v PDB pod kódem 2FOM. Vytvořeno pomocí programu PyMol [42]. Šedou barvou je vyznačen NS3 (pouze proteasa), oranžově NS2B. Katalytická triáda Ser-His-Asp je vybarvena zeleně.

Tab. 1: Porovnání důležitých přirozených štěpných míst rozeznávanými flavivirovými proteasami. DENV - N značí sérotyp viru Dengue (N=1-4), zkratkou ZIKV je míněn virus Zika.

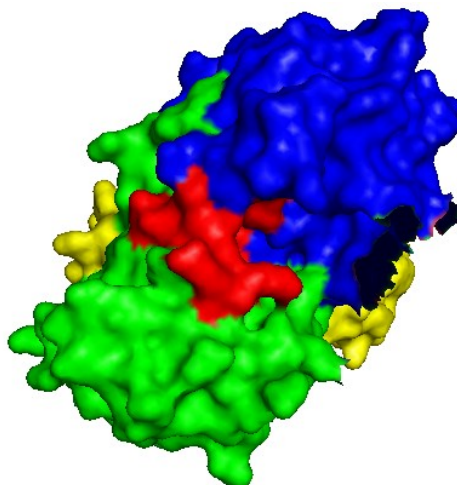
sérotyp	NS2A/NS2B	NS2B/NS3	NS3/NS4A	NS4B/NS5
DENV-1	WGRK↓SWPL	KKQR↓SGVL	AGRR↓SVSG	GGRR↓GTGA
DENV-2	SKKR↓SWPL	KKQR↓AGVL	AGRK↓SLTL	XTRR↓GTGN
DENV-3	LKRR↓SWPL	QTQR↓SGVL	AGRK↓SIAL	TGKR↓GTGS
DENV-4	ASRR↓SWPL	KTQR↓SGAL	SGRK↓SITL	TPRR↓GTGT
ZIKV	SGKR↓SWPP	TGKR↓SGAL	ADKV↓AAIE	VKRR↓GGGT

Pro studium proteasy viru Zika byly připraveny různé fúzní proteiny. Ve standardním modelu proteinu je mezi NS2B a NS3 štěpné místo rozpoznávané virovou proteasou, odpovídá tedy přirozeně se vyskytujícímu proteinu. První konstrukty flavivirových proteas obsahovaly hydrofilní cytoplazmatický úsek aktivačního peptidu NS2 spojeného krátkým spojem (angl. linker, sekvence GGGGSGGGG). Nejlepší pro krystalizaci s inhibitorem se však jevila varianta bez linkeru i bez štěpného místa, aminokyseliny 45 – 96 domény NS2B se nekovalentně vážou na zbytky 1 – 177 domény NS3 [44]. Tyto domény jsou připraveny v jedné buňce v bicistronickém plasmidu. Zkoušena byla také *trans*-aktivace NS3 proteasové domény připravené separovaně od aktivačního peptidu, která pak byla aktivována přidáním NS2B [45]. Pro proteasu viru Dengue byly připraveny varianty pouze s glycinovým linkerem [39].

Helikasová 72 kDa doména je složena ze tří subdomén a obsahuje segmenty vykazující helikasovou, nukleotid trifosfatasovou (NTPasovou) a RNA 5'-trifosfatasovou (RNAsovou) aktivitu [46]. Pro všechny tyto funkce je nutná přítomnost hořčnatých iontů [47]. RNAsa je jedním z enzymů kaskády syntetizující čepičku mRNA k zamezení rozkladu hostitelskými nukleasami a usnadnění translace [48]. Činí první translační krok, a to odštěpení fosfátového zbytku z 5'-konce primárního transkriptu. Flavivirová helikasa preferuje RNA před DNA, vyžaduje 3'-konec s přesahem [49] a při štěpení vodíkových vazeb spotřebovává ATP skrze NTPasu [50]. ATP je vázáno motivy P-smyčka (z angl. P-loop, pro Zika aminokyseliny 193-203 – sekvence DLHPGAGKTRR, pro Dengue 192-202 – sekvence DLHPGAGKTKR), motivem IV (motiv bohatý na argininy, u flavivirových helikas jsou to zejména Arg<sup>460</sup> a Arg<sup>463</sup>) a DEAH (sekvence asp-glu-ala-his) [51], [52]. Helikasy obou virů (bez proteasy) jsou zobrazeny se zvýrazněnými subdoménami na obrázcích 7 a 8.



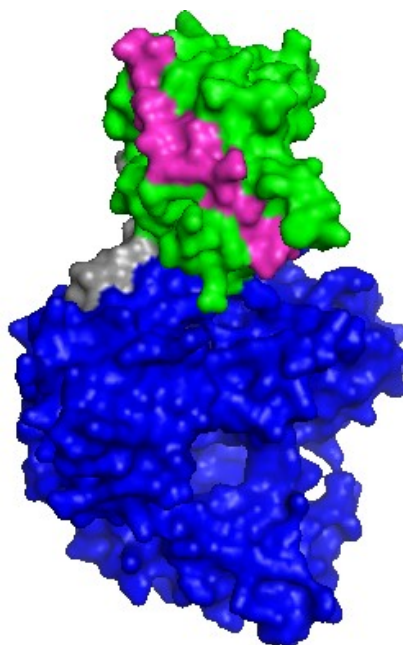
Obr. 7: RNA oligonukleotid vázaný Zika helikasou (NS3 bez proteasy), v PDB pod kódem 5GJB. Vytvořeno pomocí programu PyMol [42]. Subdomény jsou barevně odlišeny (I-zelená, II-modrá, III-žlutá). Červeně vyznačený oligoribonukleotid (AGAUC) je vázaný helikasovou doménou. Červeně je zobrazen P-loop, DEAH a motiv IV vázající ATP.



Obr. 8: Dengue helikasa bez proteasové domény, PDB kód 2BHR. Vytvořeno pomocí programu PyMol [42]. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé subdomény, zeleně subdoména I, modře subdoména II a žlutě subdoména III. Mezi subdoménami I a II se nachází ATP vazebné místo vyznačené červeně.

Proteasová doména je spojena s helikasovou krátkou sekvencí (pro DENV-4 zbytky 169-179 [53]). Vzájemné interakce NS2B aktivačního peptidu, proteasové NS3<sup>pro</sup> a helikasové domény NS3<sup>hel</sup> byla studována u variant flavivirových enzymů DENV-4 NS2B<sub>18</sub>NS3 (18 zbytků z domény NS2B), kde byla aktivita helikasy omezená, a varianta MVEV (virus encefalitidy Murray valley, který patří také mezi flaviviry) NS2B<sub>45</sub>NS3 (45 zbytků z domény NS2B), kde proteasová doména svými interakcemi již nesnižovala helikasovou aktivitu, NS2B je tedy zřejmě potřeba ke správné funkci celého enzymu [54]. Aktivační peptid nejspíše indukuje správné sbalení proteasy, čímž je zajištěno ideální sterické sbalení obou enzymových domén. Na druhou stranu, samostatná helikasa izolovaná od zbytku řetězce vykazovala nižší afinitu vůči ATP, než celý řetězec NS2B<sub>18</sub>NS3 z varianty viru DENV-4 [55]. Tento jev byl vysvětlen tím, že povrch proteasové domény pozitivně ovlivňuje vazebné místo pro RNA, čímž se zvyšuje helikasová aktivita. Další možné vysvětlení je to, že helikasa použitá ve studii byla zkrácena o linker, který ji spojuje s proteasou a přispívá pravděpodobně i k aktivitě helikasy. Proteasa izolovaná od helikasy však sníženou aktivitu nevykazuje, proto pro kinetické experimenty studující proteasovou aktivitu postačují rekombinantní proteiny obsahující pouze proteasovou část NS3 [53]. Při studii konformací se ukázalo, že vazba cca 40 zbytků NS2B kofaktoru s NS3 proteasou je vysoce preferována a proto je při

návrhu inhibitorů potřeba vzít v potaz tuto „uzavřenou“ konformaci [56]. Celý enzym je na obrázku 9.



Obr. 9: Celý NS3 protein viru Dengue sérotypu 4, v PDB pod kódem 2VBC. Obarveno pomocí programu PyMol [42]. Proteasa (zelená) s 18 zbytky kofaktoru NS2B (růžově) je spojena krátkým linkerem (šedá) s helikasou (modrá).

Pro proteasu viru Dengue již existuje řada inhibitorů. Většinou se jedná o peptidomimetika (peptidům podobné látky, které proteasa rozezná, naváže do aktivního centra, ale není schopná je štěpit) nebo cyklické peptidy (cyklizace se provádí kvůli zlepšení vstupu inhibitoru do buňky) [57]. Podobné inhibitory se zkoušejí aplikovat i na proteasu viru Zika, inhibitory se navrhuji tak, aby zabránily interakci NS2B a NS3 nebo se navázaly do aktivního centra (např. temoporfin, niklosamid a nitazoxanid inhibují interdoménovou interakci proteasy viru Zika) [45]. Toto jsou zároveň příklady léků, které již dříve prošly vývojem a klinickým testováním proti jiným onemocněním. Proteasu viru Zika inhibuje také antibiotikum novobiocin (používané k eliminaci bakterií rodu *Streptococcus*) nebo kombinace inhibitorů proteas HIV lopinavir-ritonavir [58]. Pomocí inhibitoru se též snadněji získávají krystaly pro rentgenostrukturní analýzu, protein se snáze fixuje ve stabilní konformaci (viz obrázky výše).

## 2 Cíl práce

Cílem této práce bylo:

1. Připravit bakteriální expresní plasmidy pro produkci různých forem nestrukturních proteinů NS2B a NS3 v *E. coli*, které lze využít k dalším studiím.
2. Ověřit expresi těchto variant pomocí Western blotu
3. Navrhnout možný purifikační postup a na příkladu jednoho vybraného proteinu tento postup vyzkoušet.

### **3 Metody**

#### **3.1 Polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)**

PCR slouží pro amplifikaci určitého úseku DNA, který je vymezen použitými primery. Seznam použitých primerů je v příloze 1.

##### **3.1.1 Použití Taq polymerasy pro amplifikaci krátkých fragmentů a vyhledávání bakteriálních kolonií (z angl. Colony screening)**

Pro amplifikaci krátkých úseků byla využívána Taq polymerasa, která má větší chybovost, nižší procesivitu, ale poskytuje vyšší výtěžky. Colony screening je uspořádání PCR, které se používá pro zjištění, zda bakteriální kolonie nese požadovanou variantu plasmidu, jako templát sloužil plasmid z dané bakteriální kolonie.

Reakční směs tvořilo 5  $\mu$ l PPP Master Mix (Top-Bio) a 5  $\mu$ l vody, ve které byla rozpuštěna část bakterií z příslušné kolonie a 1 mM primerů. Program byl následující: První krok probíhal při 98 °C po 1 min, druhý při 95 °C po 30 s, třetí při 55 °C po 30 s, čtvrtý při 72 °C po 30 s a pátý při 72 °C po 2 min, přičemž kroky 2-4 se opakovaly 32x. Produkty PCR byly dále analyzovány elektroforézou.

##### **3.1.2 Amplifikace dlouhých fragmentů virové cDNA pro přípravu expresních vektorů**

Pro amplifikaci fragmentů s helikasou byla používána Phusion DNA polymerasa (NEB, 2 U/ml), která dává sice nižší výtěžky, má ale malou chybovost a velkou procesivitu. Reakční směs obsahovala pufr GC (NEB), 1,75 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM dNTP, 1 mU Phusion DNA polymerasy (NEB), 1 mM primerů (pro oba směry polymerace) a templát (obvykle 0,3 – 1  $\mu$ g) který byl na pracovišti UOCHB získán reverzní transkripcí virové RNA. Pro polymeraci byl zvolen program, kdy pro rozbalení DNA na jednotlivé řetězce byla nastavena teplota 95 °C po 2 min. Poté probíhal cyklus rozbalení (98 °C, 20 s), nasedání primerů (54 °C – 72 °C podle použitých primerů, 20 s) a polymerace (72 °C, podle délky konstruktů, 20 s na kilobázi), opakován byl 30x pro syntézu dostatečného

množství DNA. Po skončení posledního cyklu byl systém ponechán 5 min při 72 °C pro doběhnutí polymerace.

## 3.2 Elektroforéza

### 3.2.1 Analýza DNA fragmentů

K analýze či separaci dosažených produktů byla využívána elektroforéza. Pro zobrazování bylo do gelu (1 % agarosový gelu v TAE (z angl. tris-acetate-EDTA, pufr obsahující tris, kyselinu octovou a ethylendiamintetraoctovou kyselinu) pufru) vmícháno barvivo GelRed (Biotium). Samotné vzorky byly smíseny se vzorkovým pufrem (40 % (w/v) sacharosa a 0,1 % (w/v) bromfenolová modř). Vedle drah vzorků byla při analýze jedna dráha vyhrazena standardu (markeru GelPilot Ladder od firmy QIAGEN), dle kterého lze určit přibližnou molekulovou hmotnost. Použitý marker je vždy u obrázku blíže specifikován. Elektroforéza probíhala při 120 V, obvykle po 20 min, v případě potřeby však i déle.

### 3.2.2 Analýza proteinových produktů

Proteinové produkty byly analyzovány metodou SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza probíhající v prostředí dodecylsírany sodného, z angl. sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel electrophoresis). Při této analýze se používaly dva gely, zaostřovací (250 mM tris o pH 6,8, 6,6 % akrylamidový mix, 0,1 % SDS, 0,1 % APS (peroxodisíran draselný, z angl. ammonium persulphate), 0,2 % TEMED (tetramethylethylendiamin)) a dělicí (312,5 mM tris o pH 8,8, 10 % akrylamidový mix, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED). Vzorky byly před aplikací na gel povařeny s pufrem (0,35 M tris pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) glycerol, 0,012 % (w/v) bromfenolová modř, 4 % (v/v) merkaptoethanol), po aplikaci putovaly při 150 V po cca 1,5 h. Výsledný gel byl buď barven stříbrem či barvivem Coomassie, nebo převeden na nitrocelulosovou membránu metodou Western blot s afinitní syntetickou kotvou iBodies [59].



### 3.2.3 Barvení gelu pomocí stříbra

Barvením pomocí stříbra lze zobrazit proteiny rozdělené pomocí elektroforézy. Gel byl nejprve fixačním roztokem 30 min (12 % (v/v) kyselina octová, 50 % (v/v) methanol, 0,05 % formaldehyd). Poté byl gel promyt roztokem 50% (v/v) methanolu, a to 3x15 min. Po 60s exponaci (roztok 0,2 g/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a promytí 3x15 s destilovanou vodou byl gel impregnován roztokem obsahujícím 2 g/l  $\text{AgNO}_3$  a 0,05 % formaldehydu (20 min). K vyvolání byl použit roztok s 60 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 mg/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0,05 % formaldehydu, do dvou minut se obvykle obarvené proteiny zobrazily. Pak byl gel promyt vodou 3x15 s a dále 12 % (v/v) kyselinou octovou v 50 % (v/v) methanolu (10 min). Poté byl gel focen a vyhodnocován.

### 3.2.4 Barvení gelu pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G-250

Gel po elektroforéze byl vložen na 30 min do fixačního roztoku (40 % methanol, 10 % kyselina octová), promyt 3x15 ml deionizovanou vodou a barven barvicím roztokem (40 % methanol, 10 % kyselina octová, 11,5 % kyselina trihydrogenfosforečná, 10 % (w/v) síran amonný, 0,12 % Coomassie Brilliant Blue G-250). Po hodině barvení bylo odbarveno pozadí gelu deionizovanou vodou a gel byl dále analyzován a zpracován.

## 3.3 Čištění DNA

Při získávání z bakterií, po štěpení enzymy či při separaci na gelu elektroforézou byla DNA čištěna od činidel, enzymů a nežádoucích chemikálií. Voleny byly různé postupy podle metody separace DNA.

### 3.3.1 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu

Prvním krokem pro získání co nejčistší DNA z PCR reakce byla izolace fragmentů DNA z agarosového gelu. Od fragmentů se tak oddělily primery, templát a fragmenty nežádoucí délky. Vzorková DNA byla rozdělena na gelu elektroforézou, pomocí UV záření byl gel prosvícen a vyfocen, viditelné pruhy byly porovnány se standardem a byla tak určena délka fragmentů DNA v jednotlivých pruzích. Z těch se následně vybral ten, který odpovídal potřebné délce fragmentů DNA, byl vyříznut ostrým skalpelem,

uchován v mikrocetrifugační zkumavce a dále čištěn komerčně dostupnou sadou QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), postupováno bylo podle přiloženého návodu.

### 3.3.2 Minipreparace plasmidové DNA

K preparaci malého množství plasmidové DNA (výrobce udává do 25 µg) sloužila komerčně dostupná sada Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo research). Kolonie narostlé na plotně byly zaočkovány do LB média s ampicilem (Biotika, 100 µg/ml) a nechány rozrůst přes noc. Druhý den byly zpracovány minipreparační sadou. Větších výtěžků se však dosahovalo maxipreparací.

### 3.3.3 Maxipreparace plasmidové DNA

Při maxipreparaci se pracovalo s větším nárůstem bakterií, k extrakci byla použita sada Plasmid Midi Kit (QIAGEN). Výrobce udává výtěžek do 100 µg plasmidu.

## 3.4 Restrikční štěpení

Pro vložení požadované sekvence (angl. insert) do vektoru (linearizovaného plasmidu) je třeba vkládanou sekvenci i plasmid specificky štěpit restrikčními endonukleasami. Enzymy používané v této práci byly KpnI, BamHI, XhoI, BstBI, SalI, SacII, SacI od firmy NEB. Tyto enzymy jsou dodávány s pufrý zajišťujícími optimální podmínky (pufrý 1.1, 2.1, 3.1, CutSmart od firmy NEB). Štěpení probíhalo u všech enzymů při 37°C přes noc, používáno bylo 10 U enzymu na 1 µg DNA (1 U je definována jako množství enzymu potřebné k naštěpení 1 µg λ DNA za 1 h při 37 °C v celkovém reakčním objemu 50 µl)

## 3.5 Vytvoření tupých konců linearizovaného vektoru (z. angl. blunting)

Použita byla T4 DNA polymerasa od NEB, tento způsob byl použit na závěr klonování, kdy bylo potřeba zbavit sekvenci restrikčních míst. Polymerasa (1 U/µg – 1 U je definována jako množství enzymu, které inkorporuje 10 nmol dNTP za 30 min při 37 °C) působila na linearizovaný plasmid 15 min při 12 °C, poté byla inaktivována přidáním 10 mM EDTA a inkubací při 75 °C po 20 min. Produkt dále podstoupil ligaci.

### 3.6 Ligace

Vektory v této práci byly získány ligací fragmentu požadované DNA a plasmidu, obojí bylo naštěpeno požadovanou dvojicí restriktčních enzymů (případně s následně na tupo zarovnanými konci). K ligaci byl použit enzym T4 DNA Ligasa (NEB), samotná směs obsahovala pufr pro T4 ligasu (NEB), insert a vektor v různých koncentracích (od 0,3 – 1 µg/µl) a 200 U enzymu T4 DNA Ligasy (NEB, 1 U je definována jako množství enzymu potřebné k ligaci 50 % fragmentů λ DNA v koncentraci 300 µg/ml štěpených HindIII v celkovém objemu 20 µl za 30 min při 16 °C v ligačním pufru). Reakce probíhala při 20 °C minimálně 10 min (pro ligaci natupo jsou doporučeny 2 h).

### 3.7 Určování koncentrace DNA, proteinů

Po vyčištění DNA nebo proteinů bylo třeba zjistit koncentraci těchto látek v roztoku. K tomu jsme využili přístroj NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), příslušný software vypočítával koncentraci z naměřené absorbance při 260 nm pro DNA, koncentraci proteinů stanovoval z absorbance při 280 nm.

### 3.8 Sekvenace

Pro sekvenaci preparované DNA jsme využili služeb firmy GATC biotech s.r.o, která používá pro sekvenaci Sangerovu metodu s fluorescenčně značenými ddNTP.

### 3.9 Transformace vektoru do bakterií

#### 3.9.1 Využívání bakterií k namnožení plasmidů

Pro získávání DNA byl vektor, který byl získán ligací, transformován do bakterií *Escherichia Coli* TOPO 10 (ThermoFisher Scientific), použito bylo vždy 30 µl suspenze kompetentních bakterií a 10 µl ligační směsi. Vzorky byly 30 min ponechány na ledu, následně byl proveden teplotní šok (angl. heat shock), kdy po 90 s zahřívání na 42 °C byly vzorky zchlazeny na ledu a ponechány tam 2 min. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 200 µl LB media a po 30 min byly vzorky nanесeny na plotny s ampicilinem

(Biotika) a nechány růst přes noc při 37°C. Narostlé kolonie nesoucí požadovaný plasmid byly identifikovány pomocí colony screening PCR (viz kap. 3.1.).

### 3.9.2 Exprese rekombinantních proteinů

Pro expresi proteinů byly použity *E. Coli* BL21 (DE3) RIL, postupovalo se stejně, jako při transformaci do klonů TOPO 10.

Kolonie *E. Coli* BL21 (DE3) RIL narostlé po transformaci s příslušným expresním plasmidem byly setřeny z ploten a přeneseny do 500 ml LB media s ampicilinem (100 µg/ml). Bakterie byly ponechány v 37 °C, růst byl sledován měřením optické hustoty.

## 3.10 Měření optické hustoty

Pro sledování růstu bakterií byla měřena optická hustota při 600 nm na stroji Eppendorf biospektrometr nejprve po 1 h, po uplynutí 2 hodin byla měření prováděna po 30 min. Bakterie rostly do optické hustoty roztoku 0,8, poté byl přidán 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG), který spustil indukci proteinů v bakteriích skrze *lac* operon. Roztok s bakteriemi byl ponechán třepat přes noc, po hodině indukce se teplota snížila na 12 °C. Z naměřených optických hustot byla sestavena růstová křivka. Ze supernatantu byly izolovány proteiny.

## 3.11 Western blot

Pro detekci požadovaného proteinu v bakteriálním lyzátu, byly proteiny rozděleny SDS-PAGE elektroforézou a přeneseny na membránu. Tento přenos se označuje jako Western blot. V této práci byla používána membrána nitrocelulosová. Naše studované proteiny mají N-konec označený histidinovou kotvou, která umožňuje její specifickou detekci. Jako detekce byla použita metoda s pomocí iBodies (název z angl. inhibitors + antibodies), vyvinutá ve skupině doc. Konvalinky [59]. V našem případě využívá syntetické polymery nesoucí Co<sup>2+</sup> kationty vázané tris-nitriloacetátovými zbytky a fluorescenční značku ATTO488.

Po elektroforéze byl gel vyjmut, odstraněn zaostřovací gel a gel dělicí byl za mokra přenesen na membránu (1 h, 100 V). Po tomto procesu byla membrána vyjmuta z přenosového zařízení a neobsazená vazebná místa byla blokována kaseinem (minimálně 1 h, pro zlepšení zobrazení i déle). Pro inkubaci s iBodies byl použit doporučený roztok 4nM iBody v TBS (z angl. tris-buffered saline) obsahující 0,2% Tween 20, 0,04% blokovací roztok kaseinu, 0,05% SDS a 1mM imidazol (inkubace minimálně 1 h). K promytí byl použit roztok TBS obsahující 0,15% Tween 20 (3x5min) a TBS (1x5min na závěr). Membrána se zachycenými proteiny byla díky fluoroforu v iBodies zviditelněna a vyfocena na přístroji Odyssey CLx Li-cor.

### 3.12 Izolace proteinů

Narostlá kultura byla stočena při 6000x g/10 min/20 °C (centrifuga Thermo Scientific Sorvall Evolution RC), supernatant byl odebrán a peleta rozsuspendována v 100 ml lyzačního pufru (50 mM tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,3) který v případě Ziky obsahoval navíc i 10 mM dithiothreitolu kvůli redukci sulfidových můstků. Dále byly vzorky homogenizovány Potter-Elvehjevovým homogenizátorem, buňky byly rozbity laborantkou na přístroji EmulsiFlex C3 (Avestin, Inc.) s rázy 1100 bar. Poté byl lyzát stočen při 20 000x g/20 min/4 °C a dále byl použit supernatant, který byl čištěn na polymeru NiNTA Agarose (Qiagen).

#### 3.12.1 Purifikace na NiNTA

Protein byl purifikován na kuličkách s navázaným nitrilotrisacetátem chelatující nikelnatý kationt, od roztoku se po hodině pevná fáze s afinitně vázaným proteinem oddělovala centrifugací (2000x g/5 min/4 °C – centrifuga Beckman Coulter Allegra X-15R). Fáze byla dále promyta promývacím pufrem (50 mM tris, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol – k odstranění nespecificky vázaných molekul, pH bylo vždy stejné jako pH lyzačního pufru), a posléze uvolněn elučním pufrem s imidazolem (50 mM tris, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol).

### 3.12.2 Purifikace iontově výměnnou chromatografií

Pro iontově výměnnou chromatografii byl vzorek dialyzován v pufru bez NaCl (50 mM tris, 14 mM  $\beta$ -merkaptoethanol, pH dle vzorku), tento pufr byl dále využíván (po zfiltrování a odvzdušnění) k promývání kolony. Vzorek byl aplikován na kolonu Mono Q 5/50 GL (Sigma-Aldrich) a vymyt gradientem iontové síly (0 – 2 M NaCl). Stejně jako u gelové chromatografie bylo k aplikaci využíváno FPLC a obsah proteinů ve frakcích byl sledován spektrometricky při 280 nm.

## **4 Použité chemikálie, sady a přístroje**

**Avestin:** EmulsiFlex C3

**Beckman Coulter:** Allegra X-15R

**Bio-Rad:** Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard

**Biotika:** Ampicilin 0,5 Biotika

**Biotium:** GelRed

**Heraeus:** Biofuge Pico

**Lach-Ner:** chemikálie – AgNO<sub>3</sub>, sacharosa, síran amonný

**Lachema:** kyselina chlorovodíková, kyselina fosforečná

**New England Biolabs (NEB):**

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ml) – 1U je definována jako množství enzymu, které inkorporuje 10 nmol dNTP do nukleové kyseliny za 30 min při 74 °C

Phusion® GC Buffer Pack (5x koncentrováno)

T4 DNA Polymerase

T4 DNA Ligase (400 000 U/ml) – 1 U je definována jako množství enzymu potřebné k ligaci 50 % fragmentů λ DNA v koncentraci 300 µg/ml štěpených HindIII v celkovém objemu 20 µl za 30 min při 16 °C v ligačním pufru

NEBuffer 1.1, 2.1, 3.1, CutSmart®, T4 ligase (10x koncentrováno)

Restriktasy – BamHI (20 000 U/ml), BstBI (20 000 U/ml), SalI (100 000 U/ml), XhoI (20 000 U/ml), KpnI (10 000 U/ml), SacI (20 000 U/ml), SacII (20 000 U/ml) – 1 U je definována jako množství enzymu, které naštěpí 1µg λ DNA za 1 hodinu při 37 °C v celkovém objemu reakční směsi 50 µl

Chemikálie – Agarosa, MgCl<sub>2</sub>

Amylose resin

**Penta:** Chemikálie – glycerol, NaCl, kyselina octová, ethanol, isopropanol, formaldehyd,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

**Promega:** Tris

**QIAGEN:** QIAquick Gel Extraction Kit, Plasmid Midi Kit, GelPilot 1 kb Ladder, NiNTA Agarose

**SDT:** Casein blocker

**Serva:** Bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue G250

**Sigma-Aldrich:**

dNTP mix

Primery (seznam v příloze)

Chemikálie – DTT, SDS, D-maltose monohydrate, IPTG, Triton X-100, TEMED, Imidazol,  $\beta$ -merkapt ethanol, EDTA, glycin, APS

Mono Q 5/50 GL

Protran BA85 nitrocellulose membrane

Westran S PVDF Protein Sequencing Membranes

**Spectrum Labs:** Spectra/Por 1 (MWCO: 6-8 kDa)

**ThermoFisher Scientific:** NanoDrop 1000, Sorvall Evolution RC, One Shot® TOPO10 Chemically Competent *E. Coli*

**Top-Bio:** PPP Master Mix

**UOCHB:** iBodies, *E. Coli* BL21 (DE3)

**USB Corporation:** Chemikálie – Tween 20, akrylamid, N,N'-methylenbisakrylamid

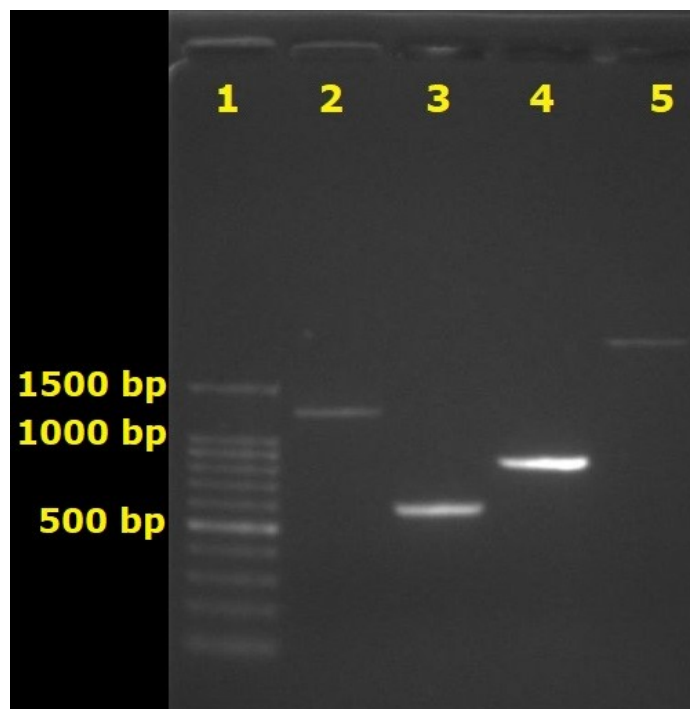
**Zymo research:** Zyppy Plasmid Miniprep Kit



## 5 Výsledky

### 5.1 Klonování rekombinantních proteinů

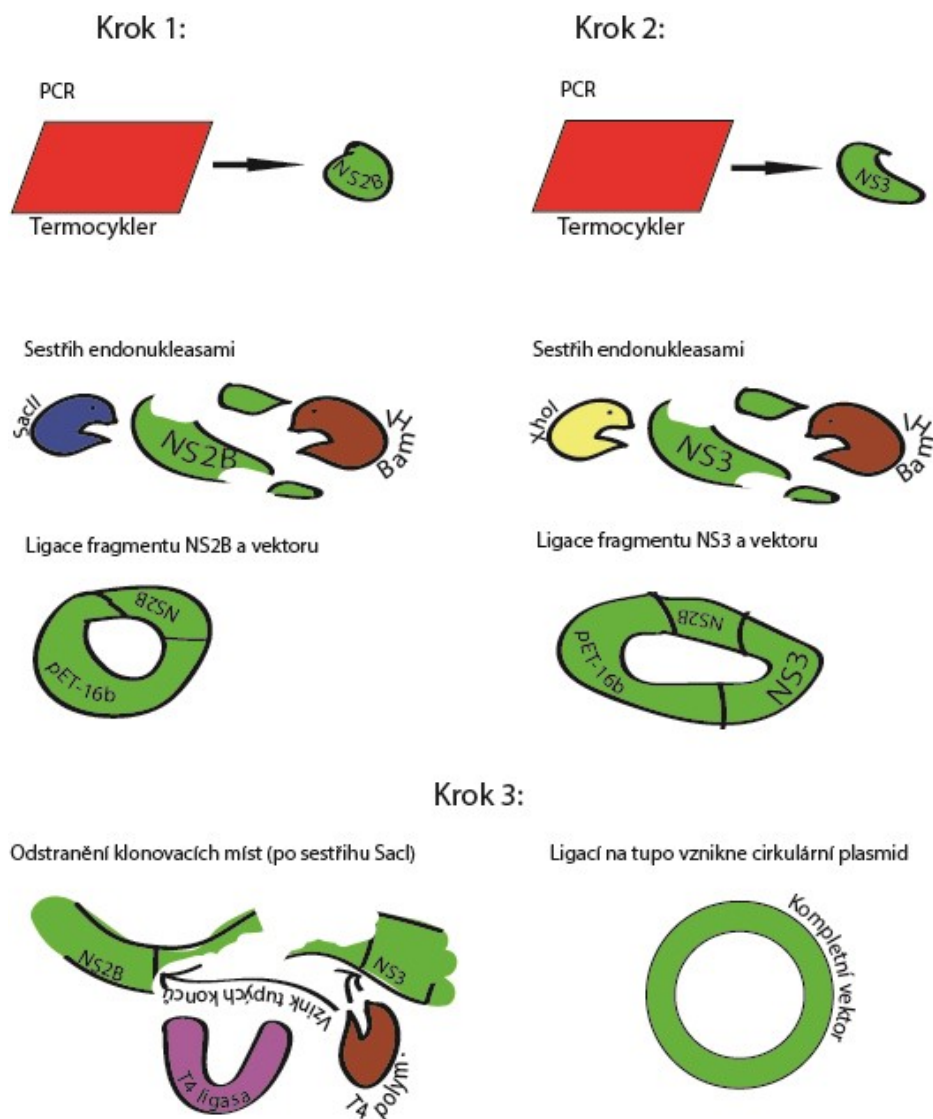
Pomocí PCR jsme získali řadu různých fragmentů kódujících NS2B a NS3, lišily se sekvencemi v místě budoucího spoje obou domén. Ukázka agarosového gelu s oddělenými produkty PCR pro vyčištění, restrikční štěpení a ligaci do linearizovaných vektorů je na obrázku 10.



Obr. 10: Produkty PCR dělené elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Dráha 1 je vyhrazena standardu GelPilot 100 bp Plus ladder (QIAGEN), výrazné značky jsou popsány svými délkami vlevo. Dráha 2 je obsazena helikasovou doménou NS3 (1293 bp), v dráze 3 putoval fragment kódující NS3 proteasu (552 bp), linie v dráze 4 náleží NS2-NS3<sup>pro</sup> (801 bp) a v dráze 5 byl dělen NS2-NS3 včetně helikasové domény (2097 bp).

Fragmenty získané metodou PCR a varianty vektoru pET-16b byly použity pro tříkrokové klonování: 1) Fragment NS2B byl štěpen odpovídající dvojicí endonukleas, stejně tak varianty vektoru pET16b, připravené na UOCHB. Oba štěpy byly spojeny T4 DNA ligasou, vznikl tak cyklizovaný vektor. 2) Podobným způsobem byl vložen fragment NS3. Po štěpení a následné ligaci tak byla celá sekvence pro požadovaný fúzní protein obsažena v plasmidu. 3) Pomocné restrikční místo bylo na závěr klonování odstraněno štěpením vektoru endonukleasou (SacI nebo KpnI) a zarovnáním

linearizovaného plasmidu T4 DNA polymerasou na tupé konce. Vektor byl následně zacyklen působením T4 DNA ligasy. Výsledné plasmidy byly takto připraveny pro vložení do bakterií a expresi proteinu. Klonovací kroky jsou schematicky znázorněny na obr. 11.



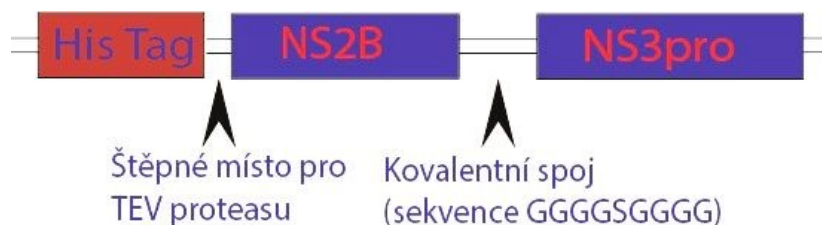
Obr. 11: Schéma třístupňového klonování. Fragment NS2B a vektor pET-16b získané metodou PCR byly štěpeny endonukleasami a spojeny T4 DNA ligasou. Poté byl připraven fragment NS3, který byl stejnou cestou vložen do sekvence plasmidu. Po naklonování obou sekvencí kódujících domény proteasy byla pomocná klonovací místa odstraněna působením restriktaas a zarovnáním obou konců linearizovaného vektoru natupo. Tupé konce byly opět spojeny DNA ligasou, vznikl tak kompletní vektor pro vložení do buněk *E.Coli* a následnou expresi.

Jednotlivé varianty se lišily C-koncem NS2B proteinu a N-koncem NS3 proteinu – bylo zde buď přirozené štěpné místo, štěpné místo pro TEV proteasu nebo kovalentní spoj GGGGSGGGG. Všechny klonované varianty jsou popsány v kapitole 5.2.

## 5.2 Připravené expresní systémy pro fúzní proteiny

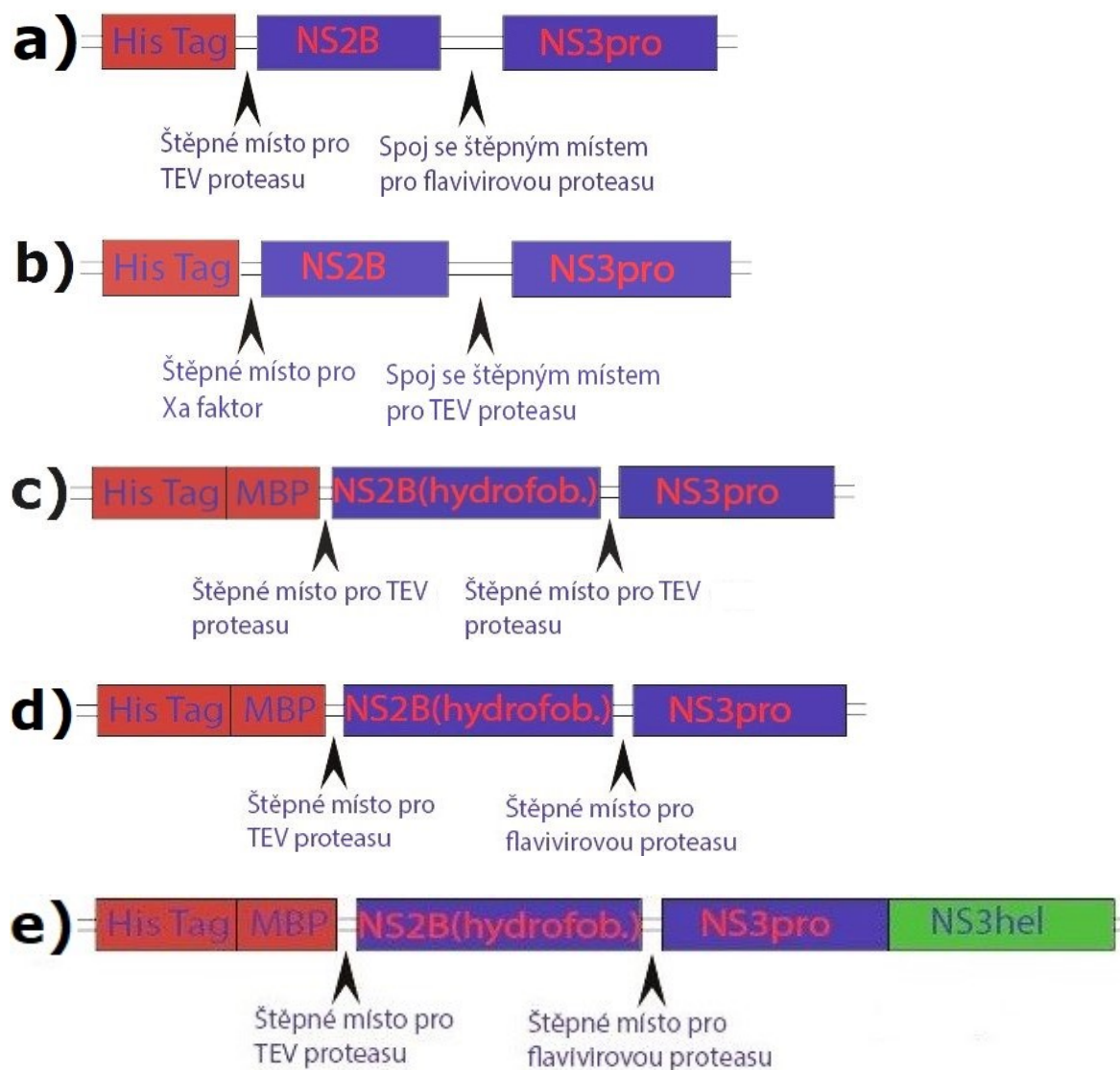
Pro studium flavivirových proteas byla připravena sada fúzních proteinů. Jednotlivé varianty se lišily C-koncem NS2B proteinu a N-koncem NS3 proteinu – bylo zde buď přirozené štěpné místo, štěpné místo pro TEV proteasu nebo kovalentní spoj GGGGSGGGG. Dále se proteiny lišily přítomností helikasové domény. Pro purifikaci byla na N-konec proteinu přidána dekahistidinová kotva. V některých případech byla použita varianta pET16b s histidinovou kotvou následovanou MBP (protein vázající maltosu, z angl. maltose binding protein) a TEV štěpným místem. Tento vektor byl také připraven na UOCHB. Toto štěpné místo, stejně jako rozpoznávací sekvence pro Xa faktor, slouží k odstranění afinitní kotvy. Varianty s TEV proteasou byly zařazeny proto, aby se flavivirová proteasa mohla aktivovat v požadovanou dobu (např. po purifikaci) působením jiné proteasy (TEV). Mapy plasmidů jsou vykresleny v příloze 3.

Konstrukt, který jsme zvolili pro optimalizaci purifikace, byl kovalentně spojený dimer. Po histidinové kotvě a štěpném místě pro TEV proteasu následovala sekvence pro hydrofilní část NS2B (aminokyseliny 45-96 pro Ziku, 49-100 pro Dengue), glycinový spoj (GGGGSGGGG) a sekvence proteasy z domény NS3 (pro Ziku zbytky 1-177, pro Dengue 1-185). Tento protein je naznačen na obrázku 12.



Obr. 12: Konstrukt s kovalentně spojenými doménami. Po histidinové kotvě (10x histidin) následovala sekvence rozeznávaná TEV proteasou (ENLYFQG). NS2B část zahrnovala aminokyseliny 45-96 (Zika) nebo 49-100 (Dengue) z přirozeně se vyskytujícího proteinu. Po kovalentním spoji (sekvence GGGGSGGGG) byla zařazena doména proteasy z NS3 proteinu viru Zika (aminokyseliny 1-177) nebo Dengue (aminokyseliny 1-185)

Kromě tohoto konstruktů, který byl dále purifikován, byly připraveny i jiné fúzní proteiny, ty jsou zobrazeny na obrázku 13. Jednou z odlišností byl spoj mezi doménami, který byl tvořen buď přirozeným štěpným místem (obr. 13 a) nebo TEV rozpoznávací sekvencí (obr. 13 b). Histidinová kotva tohoto proteinu se odstraňuje Xa faktorem.

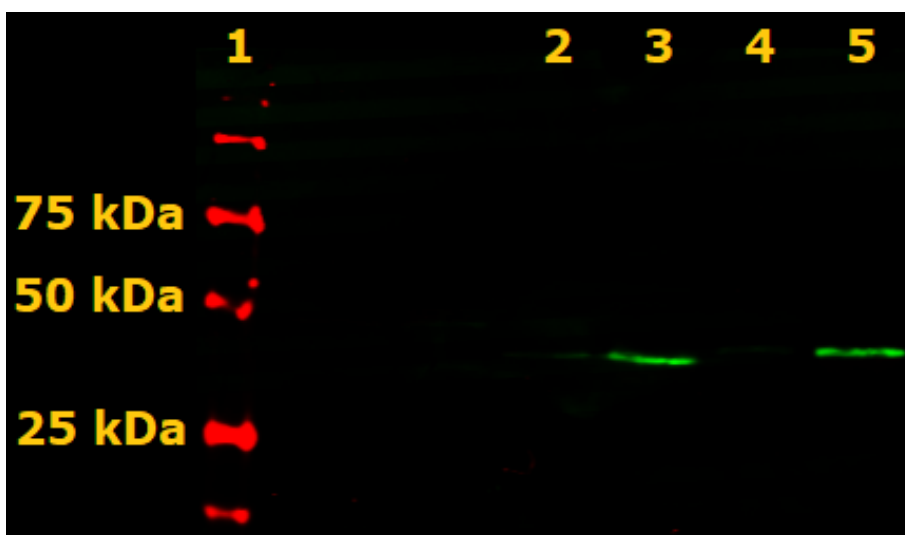


Obr. 13: Použité konstrukty cDNA. a) Mezi doménami tohoto konstruktů se nachází štěpné místo pro flavivirovou proteasu. Pro proteasu viru Zika je sekvence spoje GGGKTGKR a pro Dengue GGGVKKQR. Histidinová kotva je následována štěpným místem pro TEV proteasu, NS2B doména obsahuje pouze hydrofilní část (aminokyseliny 45-96 pro Zika variantu, 49-100 pro Dengue). NS3 proteasová doména je zastoupena aminokyselinami 1-177 pro Zika, 1-185 pro Dengue. b) Obdoba předchozího konstruktů, přirozené štěpné místo je nahrazeno štěpným místem pro TEV (ENLYFQ). Pro finální odstranění afinitní kotvy je použit faktor Xa. c) Varianta proteinu s MBP v afinitní kotvě, která se odštěpí TEV proteasou. NS2B doména je tvořena i svojí hydrofobní částí (zbytky 45-129 pro Zika, 49-133 pro Dengue). d) Obdoba předchozího konstruktů, afinitní kotvu však lze odstranit TEV proteasou a domény jsou propojeny svým přirozeným štěpným místem. e) Konstrukt s helikasovou doménou, NS2B je tvořena hydrofilní i hydrofobní doménou, NS3 tvoří 616 aminokyselinových zbytků. Pro purifikaci a zvýšenou expresi je na N-konci histidinová kotva (10x histidin) a protein vázající maltosu (MBP), z konečného produktu jsou tyto odštěpeny proteasou TEV.

Kromě variant obsahující pouze hydrofilní část NS2B byly připraveny varianty s delším aktivačním peptidem NS2B. Pro variantu Zika obsahoval zbytky 45-129 z přirozeně se vyskytujícího se proteinu, pro Dengue 49-133. Tyto varianty obsahovaly též MBP v afinitní kotvě. Vznikly tak analogy variant s TEV štěpným místem (obr. 13 c) a přirozeným štěpným místem (obr. 13 d). Navíc byla připravena varianta obsahující v NS3 proteinu i helikasovou doménu (obr. 13 e). Kompletní sekvence jsou vypsané v příloze 2.

### 5.3 Expres variant fúzních proteinů

Bakterie s plasmidem pET-16b obsahující požadovanou sekvenci byly exprimovány v *E.coli*, postup popsán v kapitole 3.9. Produkce proteinů byla analyzována metodou SDS-PAGE, případně dále technikou Western blot s použitím iBodies. Po expresi obvykle následuje purifikace, pro její optimalizaci byl vybrán konstrukt Zika proteasy s kovalentně spojenými doménami (jeho schéma je na obr. 12 na str. 25). Exprimovaný protein analyzovaný Western blotem je společně s variantou proteasy Dengue (varianta s hydrofilní doménou NS2B následovaná TEV štěpným místem) zviditelněn díky iBodies s fluorescenční značkou na obr. 14.

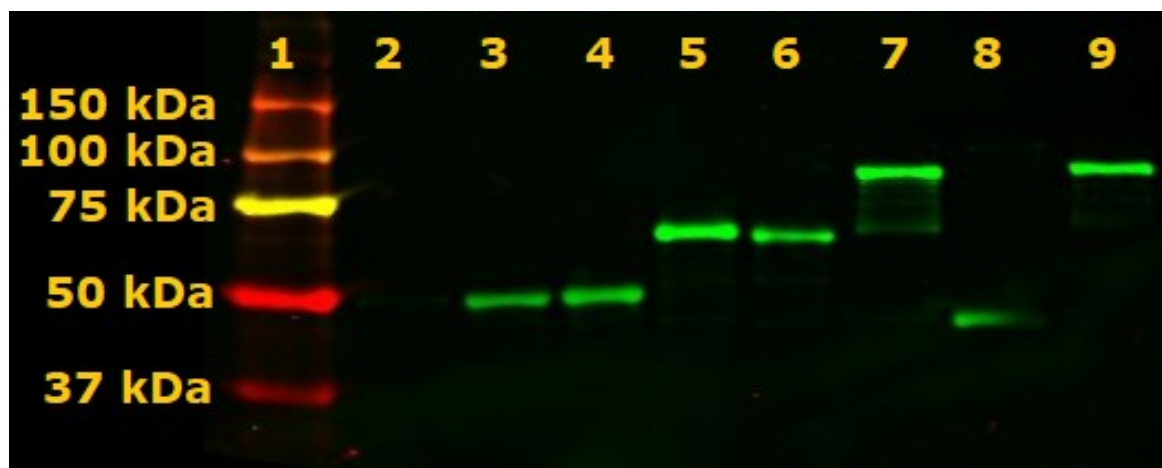


Obr. 14: Konstrukty obsahující pouze hydrofilní část domény NS2B. 1) Marker Precision Plus Protein (Bio-Rad). 2) Dengue: HisTag-TEV↓-NS2B (hydrofilní)-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>-NS3<sup>pro</sup> před indukcí. 3) Stejný konstrukt jako 2) po indukci (MW = 28 kDa). 4) Dengue: HisTag-Xa ↓-NS2B(hydrofil.)-TEV↓-NS3<sup>pro</sup> před indukcí. 5) Stejný konstrukt jako 4) po indukci (MW = 28 kDa).

Exprimovány byly i další proteiny, ty jsou popsány se svými zkratkami v tab. 2. Analýza metodou Western blot těchto expresních konstruktů je uvedena na obr. 15-18. Pro srovnání molekulových hmotností a lepší identifikaci případných štěpů byly též exprimovány proteiny HisTag-MBP a HisTag-MBP-NS2B pro oba viry. Tyto varianty jsou v prvních drahách na následujících obrázcích. Sekvence celých konstruktů je v příloze 2.

Tab. 2: Zkratky použité k popisu variant fúzních proteinů. V závorce je uvedeno sekvenční číslo, podle kterého lze přesnou variantu dohledat jak v příloze 2, tak v archivu plasmidů na UOCHB.

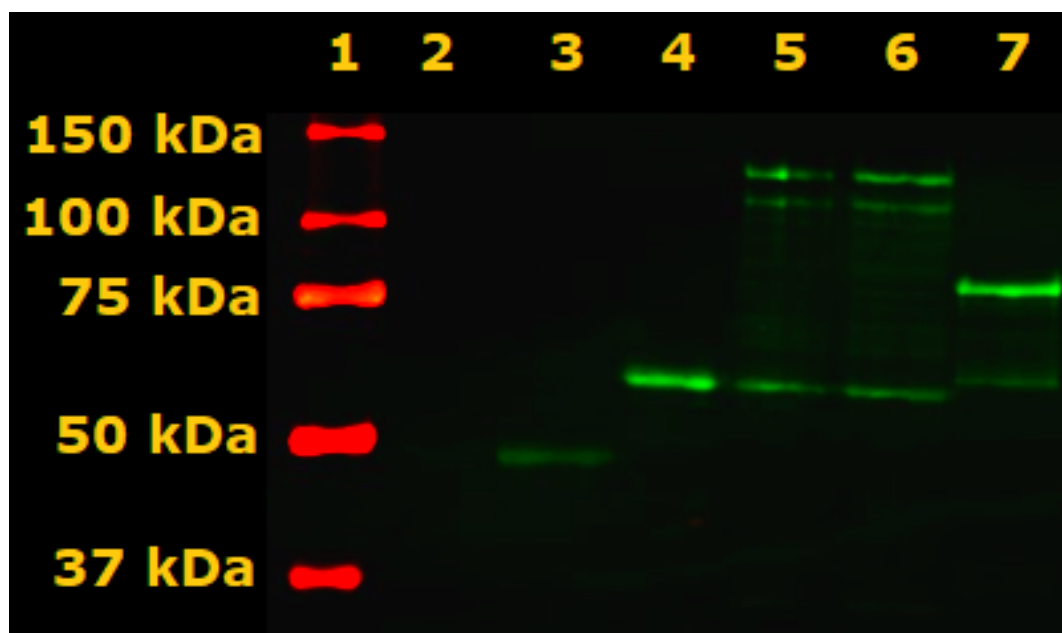
Zkratka (sekv. č.)	Sekvence
Kd (Z:35GF91, D:35GH53)	HisTag-TEV↓-NS2B(hydrofil.)-G4SG4-NS3 <sup>pro</sup>
Hel (Z:35GD25, D:85FD20)	HisTag-MBP-TEV↓-NS2B(hydrofob.)-natur ↓-NS3 <sup>pro</sup> <sub>hel</sub>
Hfob (Z:86BJ62, D:35GI24)	HisTag-MBP-TEV↓-NS2B(hydrofob.)-natur ↓-NS3 <sup>pro</sup>
TEVfil (Z:85GA17, D:35GH16)	HisTag-Xa ↓-NS2B(hydrofil.)-TEV↓-NS3 <sup>pro</sup>
TEVfob (Z:87BJ41, 80GG58, 80GG48, D:80BC25, 80BC22)	HisTag-MBP-TEV↓-NS2B(hydrofob.)-TEV↓-NS3 <sup>pro</sup>
Hfil (Z:35GI53, D:35GI63)	HisTag-TEV-NS2B(hydrofil.)-natur ↓-NS3 <sup>pro</sup>



Obr. 15: Expres proteasových konstruktů. 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), k pruhům jsou přiřazeny jejich molekulové hmotnosti. 2) Lyzát bakterií s plasmidem obsahující sekvenci HisTag-MBP (před indukcí IPTG). 3) Vzorek stejných bakterií jako 2) po indukci a inkubaci při 37 °C po 2 h (MW = 45 kDa). 4) HisTag-MBP po indukci a inkubaci při 8 °C přes noc. 5) Exprimovaný protein HisTag-MBP-TEV↓-NS2B viru Dengue včetně hydrofobní části (MW = 54 kDa). 6) Stejný protein jako 5), varianta pro virus Zika. 7) Dengue: Pro. Inkubace při 10 °C přes noc. 8) Stejný konstrukt jako 7) pro virus Zika. 9) Dengue: Pro, inkubace při 37 °C 2 h.

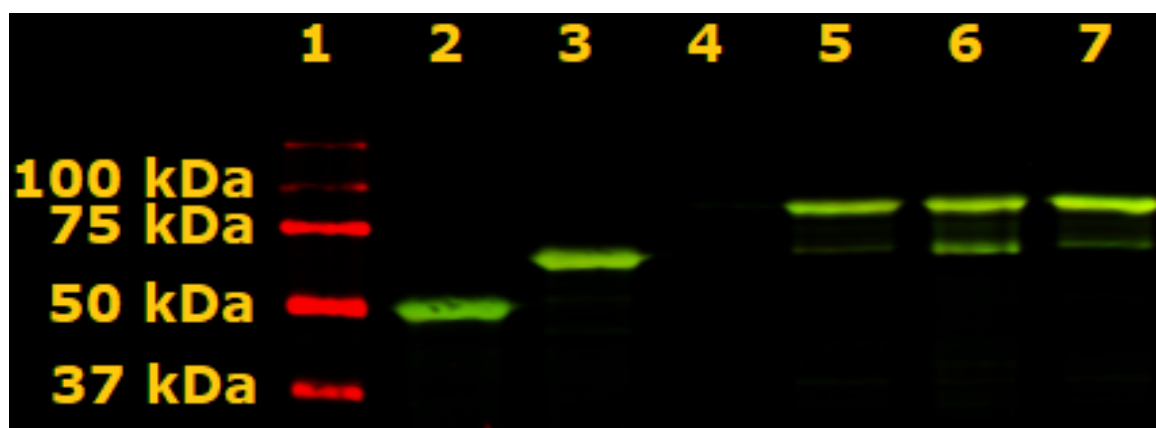


Přítomnost více proteinů různých molekulových hmotností na obr. 15 v dráze 7 poukazuje na autokatalytické štěpení aktivního enzymu. Pruh v dráze 8 náležící variantě Zika je oproti Dengue posunut, zřejmě se tedy také autokatalyticky štěpí, ale vykazuje větší aktivitu než Dengue varianta.



Obr. 16: Expresce helikasových konstruktů. 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), popsán vlevo. 2) Konstrukt HisTag-MBP z buněk před indukcí. 3) Stejný protein jako v dráze 2) po indukci (MW = 45 kDa). 4) Rekombinantní protein viru Zika: HisTag-MBP-TEV↓-NS2B (hydrofob.) z bakterií po indukci (MW = 54 kDa). 5) & 6) Zika: Hel (mol. hm. celého proteinu 123 kDa). 7) Dengue: Pro (MW = 74 kDa).

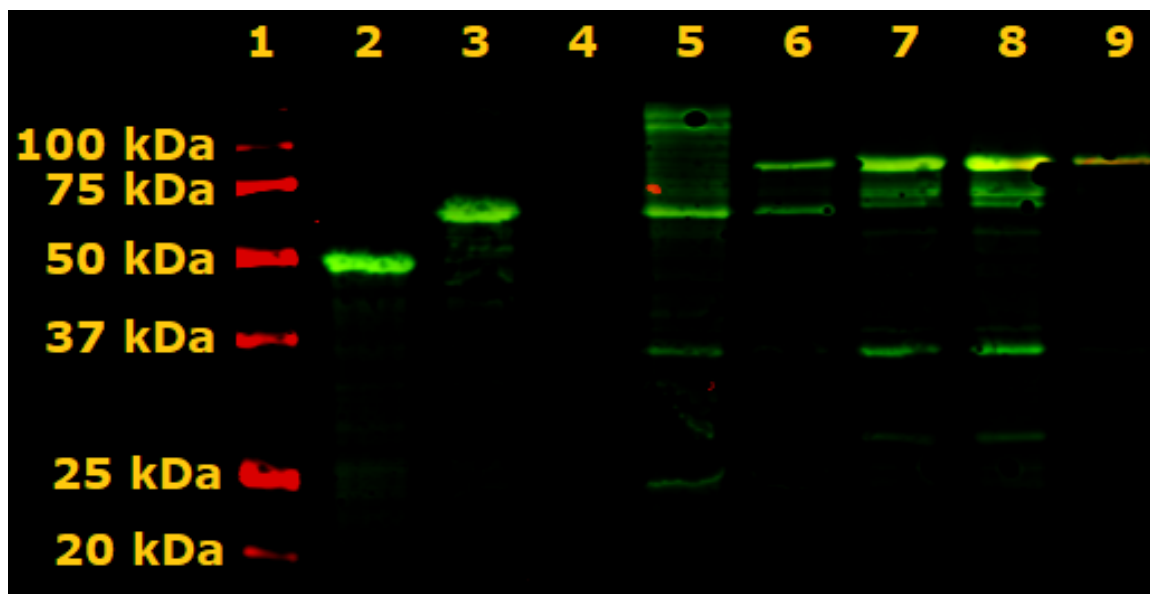
Množství pruhů v drahách 5 a 6 na obrázku 16, které obsahují helikasový konstrukt, je způsobeno štěpy různé délky. Z tohoto lze usuzovat, že enzym je aktivní.



Obr. 17: Exprimované konstrukty viru Dengue. V dráze 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), popsán vlevo. 2) Konstrukt HisTag-MBP z lyzátu bakterií po indukci IPTG (MW = 45 kDa). 3) HisTag-MBP-TEV↓-NS2B (hydrofob.) po indukci (MW = 54 kDa). 4) TEVfob (varianta).

80BC22) před indukci. 5) Stejný konstrukt jako 4) po indukci. 6) TEVfob (varianta 80 BC25). 7) Pro (včetně hydrofobní domény).

U všech variant proteasy viru Dengue s TEV štěpným místem mezi doménami (na obr. 17) můžeme vidět, že navzdory pozmeněnému štěpnému místu se konstrukt štěpí.



Obr. 18: Exprimované konstrukty viru Zika. V dráze 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, popis vlevo). 2) Lyzát bakterií po indukci IPTG obsahující konstrukt HisTag-MBP (MW = 45 kDa). 3) HisTag-MBP-TEV↓-NS2B (hydrofob.) po indukci (MW = 54 kDa). 4) Konstrukt Hel před indukci. 5) Stejný konstrukt jako 4) po indukci (MW = 123 kDa). 6) Konstrukt Pro po indukci (MW = 74 kDa). 7) TEVfob (87BJ41). 8) TEVfob (80GG48). 9) TEVfob (80GG58). TEV varianty jsou označeny sekvenčními čísly, dle kterých lze nalézt sekvenci v příloze 2.

Na obrázku 18 jsou v drahách 7-9 různé varianty s TEV štěpným místem. Liší se zahrnutými doménami z NS2B, celé sekvence jsou k nahlédnutí v příloze 2. V dráze 9 je varianta se zkráceným NS2B proteinem o dvě aminokyseliny, autokatalytické štěpení zde nepozorujeme.

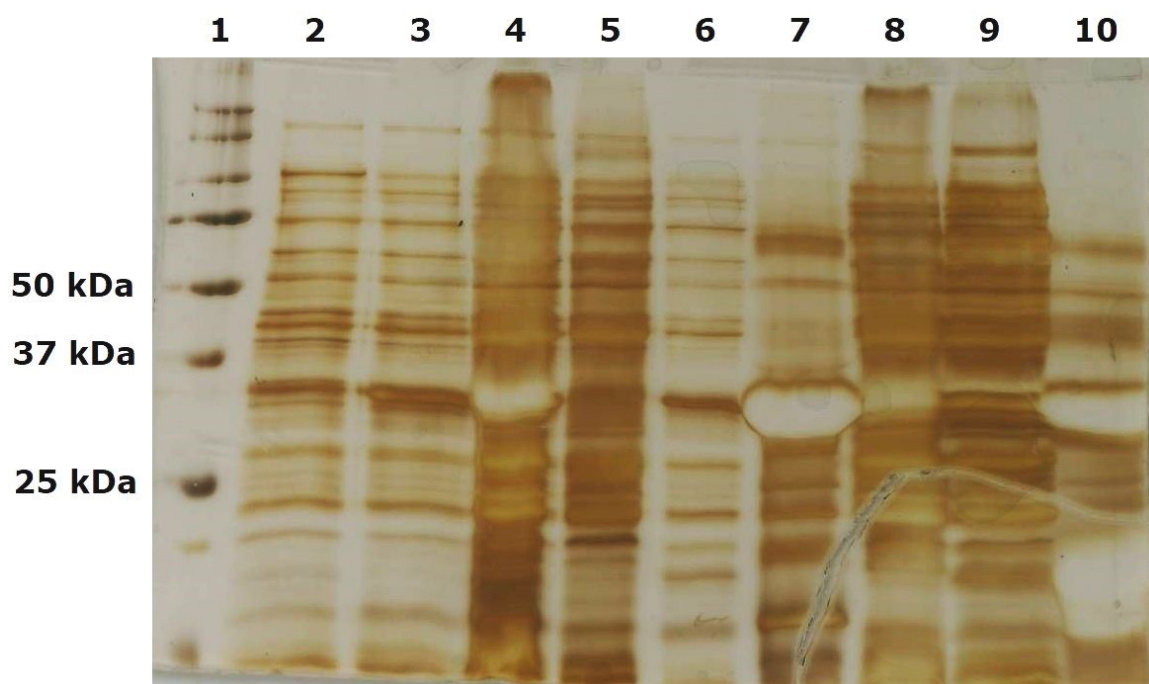
## 5.4 Návrh purifikačního postupu

Jeden vybraný protein byl pokusně vyčištěn, a to Zika: HisTag-TEV↓-NS2B(hydrofil.)-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>-NS3<sup>pro</sup>. Po nárůstu bakterií obsahující plasmid s fúzním proteinem a indukci IPTG (postup v kapitole 3.9) byla bakteriální suspenze (1 litr) přibližně po 20 h

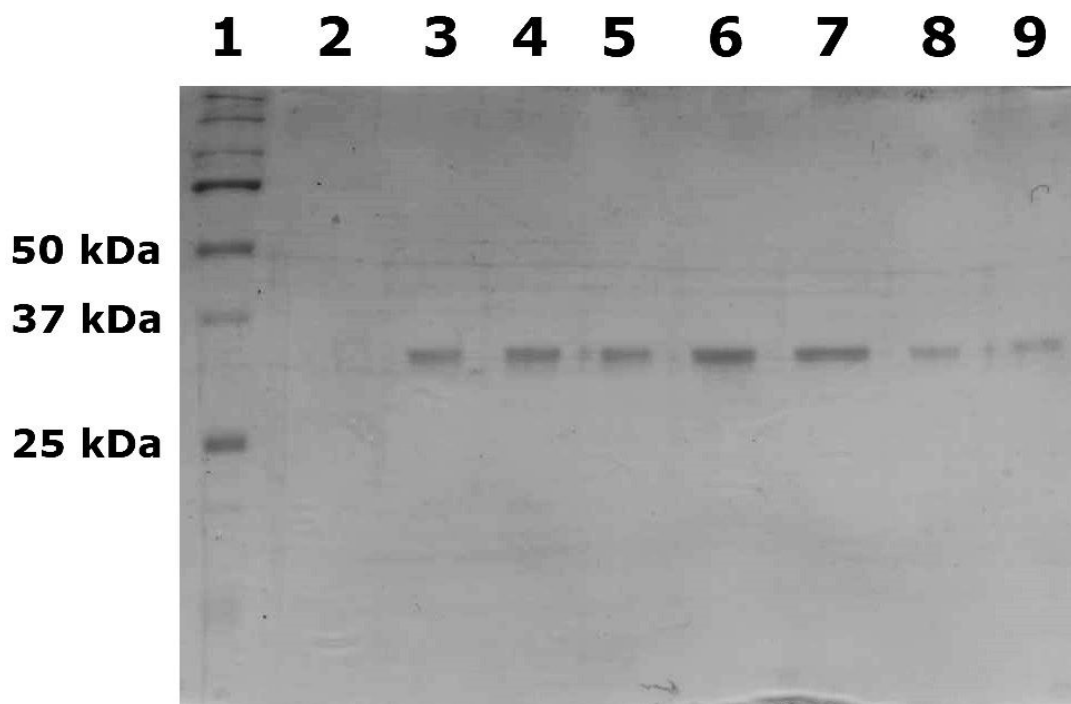


centrifugována a sediment byl rozsuspendován v lyzačním pufru (50 ml). Buňky byly po homogenizaci rozbity laborantkou přístrojem EmulsiFlex C3, lyzát byl následně čištěn chromatograficky (detaily postupu společně s přesným složením pufrů jsou uvedeny v kapitole 3.12).

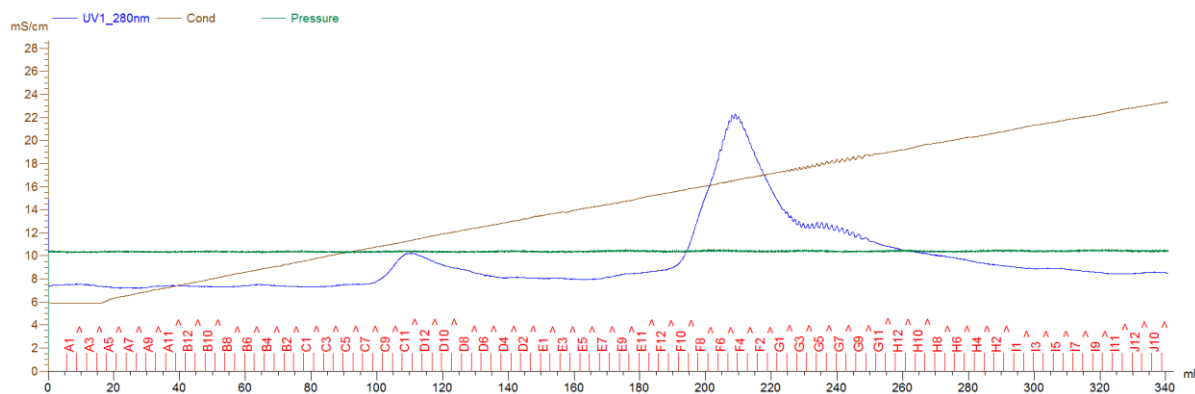
V prvním kroku byla využita vsádková afinitní metoda s využitím histidinové kotvy vázající se na Ni-NTA. Poté lze odstranit afinitní kotvu pomocí TEV proteasy. Tento krok byl vynechán, protože purifikovaný protein bude později použit v aplikacích, kde se pracuje s proteinem imobilizovaným právě díky histidinové kotvě. Eluce proběhla 3x po 3 ml, celkově tak bylo získáno 9 ml roztoku obsahující vzorek. Protein byl dále přečištěn pomocí iontové výměnné chromatografie. Fáze jednotlivých purifikačních kroků byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, akrylamidové gely byly barveny stříbrem (obr. 19 a 20). Výtěžky z jednotlivých frakcí (každá o 3 ml) získaných iontově výměnnou chromatografií jsou uvedeny v tabulce 3. Ukázka chromatogramu je na obr. 21.



Obr. 19: První kroky purifikace, konstrukt Z Kd. 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), popsán vlevo. Nanáška 1  $\mu$ l. 2) Vzorek bakterií před indukcí. Nanáška 20  $\mu$ l, odebráno z 500 ml kultury. 3) Vzorek bakterií po indukcí IPTG. Nanáška 20  $\mu$ l, odebráno z 500 ml kultury. 4) Vzorek bakteriálního lyzátu po emulziflexu. Bílá skvrna mezi 37 a 25 kDa je purifikovaný protein. Nanáška 5  $\mu$ l z 50 ml lyzátu. 5) Frakce z Ni-NTA, proteiny nezachycené na koloně (1. průtok). Nanáška 5  $\mu$ l z 50 ml lyzátu. 6) První promývací frakce z Ni-NTA. Nanáška 5  $\mu$ l z 10 ml. 7) První eluce získaná z kolony s Ni-NTA. Nanáška 5  $\mu$ l ze 3 ml eluční frakce. 8) Druhý průtok kolonou s Ni-NTA. Nanáška 5  $\mu$ l z 50 ml lyzátu. 9) Třetí průtok kolonou s Ni-NTA. Nanáška 5  $\mu$ l z 50 ml lyzátu. 10) Spojené eluce po třech opakování afinitní chromatografie na Ni-NTA. Nanáška 5  $\mu$ l z 9 ml spojených elučních frakcí. Pruh pod 25 kDa je pravděpodobně štěp purifikovaného enzymu vzniklý působením bakteriálních proteas.



Obr. 20: Elektroforeticky rozdělené frakce z iontové výměnné chromatografie, konstrukt Zika: Kd. Gel barvený Coomassie Brilliant Blue. Nanáška vzorků 10  $\mu$ l z 3 ml frakce. 1) Marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad), popsán vlevo. Nanáška 1  $\mu$ l. 2) Frakce vyteká při nanáše vzorku na kolonu. 3) Frakce F1. 4) Frakce F2. 5) Frakce F3. 6) Frakce F4. 7) Frakce F5. 8) Frakce F6. 9) Frakce F7.



Obr. 21: Ukázka chromatogramu z iontové výměnné chromatografie, čištěným proteinem je Zika: Kd. Protein opouští kolonu kolem 16 mS/cm, což odpovídá přibližně 100mM roztoku NaCl.

Tab. 3: Výtěžek z purifikace konstruktů Zika: Kd z 1l kultury.

Chromatografická frakce	Výtěžek (mg)
F1	1,02
F2	1,02
F3	1,26
F4	1,32
F5	1,29
F6	0,69
F7	1,14
F8	1,26
CELKEM	9,00 mg/l

Frakce po Ni-NTA obsahovala mnoho příměsí, které se iontově výměnnou chromatografií podařilo odstranit. Z 1 litru kultury tímto způsobem bylo získáno 9,00 mg fúzního proteinu Z: HisTag-TEV↓-NS2B-GGGGSGGGG-NS3<sup>pro</sup>.

## 6 Diskuze

Při expresi konstruktů s TEV štěpným místem jsme zjistili, že se proteiny samovolně štěpí i přes to, že štěpné místo chybí (viz strana 29 – obr. 17 a str. 30 – obr. 18). Je tedy možné, že virová proteasa rozpoznává alternativní štěpná místa (např. posunutá směrem do NS2B/NS3 domény) nebo je štěpen MBP. Tuto hypotézu je možno doložit srovnáním obrázků 14 – str. 27 a 17 – str. 29, kde produkt neobsahující MBP nevykazuje sérii fragmentů. MBP bylo zařazeno kvůli zvýšení exprese, v našem případě však byla exprese dostatečná i u variant bez MBP. Do budoucna se tedy plánuje využití variant proteinů bez MBP, odpadne tak problém s jeho možným štěpením. Plánuje se analýza pomocí metody DIANA, což je metoda vyvinutá v laboratoři doc. Jana Konvalinky sloužící k testování potenciálních inhibitorů [60], velká doména MBP by tato měření mohla také ovlivňovat. Tato metoda využívá kvantitativní PCR (qPCR), kdy je na destičku selektivně přichycen cílový protein (například pomocí histidinové kotvy, využít může být právě námi purifikovaný kovalentní dimer, který tuto kotvu obsahuje) a inkubován se sondou obsahující domnělý inhibitor spojený s oligonukleotidem DNA. Množství vázané sondy je kvantifikováno právě pomocí qPCR.

Domnělá transmembránová část NS2B může mít vliv na expresi. Je totiž pravděpodobné, že vzhledem ke své hydrofobní povaze bude ulpívat na buněčných membránách a zůstávat v membránové frakci nebo bude precipitovat. Systém by tak poskytoval nižší výtěžky než systém produkující peptid bez hydrofobní domény, což je skutečnost, která by do budoucna mohla být zkoumána. Dále je však také možné zkoumat vliv této části aktivačního peptidu na aktivitu proteasy. Lze srovnat konstrukty s hydrofilní a hydrofobní částí NS2B, kdy hydrofobní konstrukty vykazují větší míru autoprocitivity (viz např. obr. 14 – str. 27 a obr. 15 – str. 28), to by mohlo nahrávat hypotéze zvýšené aktivity proteasové domény. Dalším mechanismem může být to, že je protein naopak více rozbalený, tudíž dostupnější pro bakteriální proteasy. Do budoucna bude nutné určit, zda je alternativním štěpným místem MBP doména (jak již bylo zmíněno) nebo NS2B hydrofobní doména. Dále je třeba zjistit, zda štěpy vznikly působením aktivnější flavivirové proteasy nebo bakteriálních proteas a štěpy by tedy mohly být eliminovány zkrácením času pobytu proteinu v buněčném lyzátu.

Navržený purifikační postup by mohl být aplikován na všechny námi připravené fúzní proteiny díky podobnosti jejich izoelektrického bodu. Pro dočištění proteinu by šlo využít gelové permeační chromatografie. Tato metoda se osvědčuje jako poslední purifikační krok před krystalizací. Je však zdoluhavější než iontově výměnná chromatografie, hrozí též význačné snížení výtěžku proteinu.

Konstrukty budou v budoucnu využity pro další zkoumání. Plánuje se zejména testování knihoven inhibitorů, s využitím rozsáhlé knihovny biologicky aktivních látek na UOCHB AV ČR („IOCB library“). Pro tento účel bude vyvinuta metoda s vysokou propustností („high throughput assay“) umožňující testování tisíců sloučenin denně. Metoda bude založena na již zmíněné metodě „DIANA“.

Dále předpokládáme i racionální „structure based“ návrh inhibitorů a konečně kinetické analýzy a výzkum aktivující interakce NS2B a NS3. Tématy našeho zájmu mohou být identifikace alternativního štěpného místa v helikase viru Zika a jeho význam *in vivo* nebo příprava *trans*-aktivačního systému, kdy jsou separovaně exprimovány oba proteiny a po smíšení lze pozorovat příslušnou aktivitu.

## **7 Závěr**

Výsledkem této práce jsou expresní systémy rekombinantních proteinů flavivirů Zika a Dengue zobrazených na obrázcích 12 a 13. Konstrukty jsou zaklonovány do vektoru pET-16b nebo jeho variant, kde je rozpoznávací sekvence pro Xa faktor nahrazena sekvencí pro TEV proteasu. Správnost vytvořených sekvencí byla potvrzena sekvenacemi zprostředkovanými firmou GATC biotech. Exprese byla též ověřena a analyzována metodou SDS-PAGE s přenosem na nitrocelulosovou membránu metodou Western blot a zobrazením pomocí iBodies. Dále byl navržen a vyzkoušen purifikační postup pomocí Ni-NTA a iontové výměnné chromatografie.

Konstrukty budou využity při studiu proteasové a helikasové aktivity, vlivu NS2B a mutací v této doméně na aktivitu, pro testování potenciálních proteasových a dimerizačních inhibitorů využitelných pro přípravu léčiva.

## Literatura:

- [1] <http://www.freebookcentre.net/biology-books-download/General-Virology.html> (Navštíveno: 25. února 2017)
- [2] E. R. A. Oliveira, R. Mohana-Borges, R. B. de Alencastro, B. A. C. Horta: *Virus Res.*, 227, 115–123 (2017)
- [3] D. M. Knipe a P. Howley: *Fields Virology*, Sixth edition (2013)
- [4] [https://viralzone.expasy.org/24?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species) (Navštíveno: 16. dubna 2018)
- [5] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22 (2005)
- [6] C. Kang, T. H. Keller, D. Luo: *Trends Microbiol.* 10, 797–808 (2017)
- [7] A. Chippaux: *Médecine Mal. Infect.* 33, 377–384 (2003)
- [8] G. Kuno, G.-J. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, C. B. Cropp: *J. Virol.* 72, 73–83 (1998)
- [9] T.-H. Wen, M.-H. Lin, H.-J. Teng, N.-T. Chang: *Appl. Geogr.* 62, 256–266 (2015).
- [10] K. E. Kistler, L. B. Vossell, B. J. Matthews: *Cell Rep.* 11, 51–60 (2015)
- [11] <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/50636/title/GM-Mosquitoes-Closer-to-Release-in-U-S-/> (Navštíveno: 3. února 2018)
- [12] <http://www.oxitec.com/our-solution/technology/the-science/> (Navštíveno: 20. dubna 2018)
- [13] <http://www.oxitec.com/fda-publishes-final-finding-no-significant-impact-environmental-assessment-oxitecs-self-limiting-mosquito/> (Navštíveno: 23. dubna 2018)
- [14] E. Rancès, Y. H. Ye, M. Woolfit, E. A. McGraw, S. L. O'Neill: *PLOS Pathog.* 8, 1002548 (2012)
- [15] G. W. A. Dick, S. F. Kitchen, A. J. Haddow: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520 (1952)
- [16] Musso D.: *Emerging Infectious Diseases* 21, 1887 (2015)
- [17] I. Gladwyn-Ng et al.: *Nat. Neurosci.* 21, 63–71 (2018)
- [18] R. S. S. Azevedo et al.: *Sci. Rep.* 8, 1 (2018)
- [19] Q. Liang et al.: *Cell Stem Cell* 19, 663–671 (2016)
- [20] D. Cloëta et al.: *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 7799–7810 (2013)
- [21] H. Kukreti et al.: *Virol. J.* 6, 1 (2009)
- [22] A. P. Durbin et al.: *Virology* 376, 429–435 (2008)
- [23] A. Srikiatkachorn, A. Mathew, A. L. Rothman: *Semin. Immunopathol.* 39, 563–574 (2017)
- [24] O. Dammann, M. O'Shea: *Clin. Perinatol.* 35, 643 (2008)
- [25] R. Khandia et al.: *Front. Immunol.* 9, 597 (2018)
- [26] N. Modhiran, S. Kalayanarooj, S. Ubol: *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e924 (2010)
- [27] D. J. Gubler: *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496 (1998)
- [28] [http://ecdc.europa.eu/en/publications/\\_layouts/forms/Publication\\_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1052](http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1052) (Navštíveno: 30. května 2017)
- [29] A. A. Al-Qahtani, N. Nazir, M. R. Al-Anazi, S. Rubino, M. N. Al-Ahdal: *J. Infect. Dev. Ctries.* 10, 201–207 (2016)
- [30] S. C. Weaver, W. K. Reisen: *Antiviral Res.* 85, 328 (2010)
- [31] J. V. J. Silva, T. R. R. Lopes, E. F. de Oliveira-Filho, R. A. S. Oliveira, R. Durães-Carvalho, L. H. V. G. Gil: *Acta Trop.* 182, 257–263 (2018)
- [32] C. R. Vicente, K.-H. Herlinger, G. Fröschl, C. Malta Romano, A. de Souza Areias Cabidelle, C. Cerutti Junior: *BMC Infect. Dis.* 16, 320 (2016)

- [33] <https://www.nature.com/articles/nri.2017.132> (Navštíveno: 12. února 2018)
- [34] E. Fernandez, M. S. Diamond: *Curr. Opin. Virol.* 23, 59–67 (2017)
- [35] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.13091/full> (Navštíveno: 12. února 2018)
- [36] J. Devillers: *SAR QSAR Environ. Res.* 29, 103–115 (2018)
- [37] E. De Clercq, G. Li: *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747 (2016)
- [38] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1110/ps.25502/full> (Navštíveno: 30. května 2017)
- [39] C. Nitsche, S. Holloway, T. Schirmeister, C. D. Klein: *Chem. Rev.* 114, 11348–11381 (2014)
- [40] M. Cox, D. Nelson: *Lehninger Principles of Biochemistry*, vol. 5. (2000)
- [41] [http://biology.kenyon.edu/BMB/Jmol2008/Paige\\_Anna/](http://biology.kenyon.edu/BMB/Jmol2008/Paige_Anna/) (Navštíveno: 12. února 2018)
- [42] [https://www.researchgate.net/publication/225159692\\_The\\_PyMOL\\_Molecular\\_Graphics\\_System\\_2002\\_DeLano\\_Scientific\\_Palo\\_Alto\\_CA\\_USA\\_httpwwwpymolorg](https://www.researchgate.net/publication/225159692_The_PyMOL_Molecular_Graphics_System_2002_DeLano_Scientific_Palo_Alto_CA_USA_httpwwwpymolorg) (Navštíveno: 5. května 2018)
- [43] D. Luo, S. G. Vasudevan, J. Lescar: *Antiviral Res.* 118, 148–158 (2015)
- [44] W. W. Phoo et al.: *Nat. Commun.* 7, 13410 (2016)
- [45] Z. Li et al.: *Cell Res.* 27, 1046–1064 (2017)
- [46] D. Luo et al.: *EMBO J.* 27, 3209–3219 (2008)
- [47] D. Benarroch, B. Selisko, G. A. Locatelli, G. Maga, J.-L. Romette, B. Canard: *Virology* 328, 208–218 (2004)
- [48] M. Bisailon, G. Lemay: *Virology* 236, 1–7 (1997)
- [49] C.-C. Wang, Z.-S. Huang, P.-L. Chiang, C.-T. Chen, H.-N. Wu: *FEBS Lett.* 583, 691–696 (2009)
- [50] J. J. Incicco, L. G. Gebhard, R. M. González-Lebrero, A. V. Gamarnik, S. B. Kaufman: *PLOS ONE* 8, e58508 (2013)
- [51] H. Tian et al.: *Protein Cell* 7, 562–570 (2016)
- [52] T. Xu et al.: *J. Virol.* 79, 10278–10288 (2005)
- [53] D. Luo, T. Xu, C. Hunke, G. Gruber, S. G. Vasudevan, J. Lescar: *J. Virol.* 82, 173–183 (2008)
- [54] M. Bollati et al.: *Antiviral Res.* 87, 125–148 (2010)
- [55] J. Lescar et al.: *Antiviral Res.* 80, 94–101 (2008)
- [56] C. Nitsche, S. Holloway, T. Schirmeister, C. D. Klein: *Chem. Rev.* 114, 11348–11381 (2014)
- [57] S. P. Lim et al.: *Antiviral Res.* 100, 500–519 (2013)
- [58] S. Yuan et al.: *Antiviral Res.* 145, 33–43 (2017)
- [59] <https://ibodies.eu/> (Navštíveno: 19. února 2018)
- [60] <https://www.dianabiotech.com/> (Navštíveno: 19. února 2018)



## **Přílohy (5 stran):**

Příloha 1 – Seznam použitých primerů

Příloha 2 – Srovnání sekvencí použitých fúzních proteinů

Příloha 3 – Mapy upravených plasmidů pET16b

## Příloha 1: seznam použitých primerů

Označení	Sekvence	Popis (v závorce sekvenační číslo varianty proteinu)
DenUpNS2SaIorXho	TTTGTCGACGCCGATCTCGAGCTGG	Přímý primer Dengue NS2 (všechny varianty)
DdwnSacISacIIBamHI	TTTGGATCCTTTCCGCGGGAGCTCCTCCAGTGTTTGTTCTTCCTCCTCA	Zpětný primer Dengue NS2 hydrofilní (35GI63, 35GH53, 35GH16)
Up DenKdGly SacIISacI	TTTCCGCGGGAGCTCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGCGCGGAGTATTGTGG	Přímý primer Dengue NS3 pro kovaletní dimer (35GH53)
Up DenKdtev SacIISacI	TTTCCGCGGGAGCTCGAAAACCTGTATTTTCAGGGTGCCGGAGTATTGTGG	Přímý primer Dengue NS3 pro TEV štěpné místo (35GH16)
Dns3UpSacIISacI	TTTCCGCGGGAGCTCGGCGGCAGCAAAAAACAGCGCGGCGGCGTGTGTG	Přímý primer Dengue NS3 pro přirození štěpné místo (35GI63)
DwnD3PRBamH	TTTGGATCCTATTACTTTTCGGAAAATGTCA	Zpětný primer Dengue NS3 proteasa (35GI63, 35GH53, 35GH16)
DwnD3HelBamH	TTTGGATCCTATTACTTTCTTCCGGGCTGC	Zpětný primer pro Dengue NS3 helikasa (85FD20)
D3gXhoI	TTTTCTCGAGAACCTGTATTTTCAGGGTGAGTATTGTGGGATG	Přímý primer pro Dengue NS3 TEV štěpné místo substituované (80BC25)
D3plusXhoI	TTTTCTCGAGAACCTGTATTTTCAGGGTGCCGGAGTATTGTGGGATG	Přímý primer pro Dengue NS3 TEV štěpné místo vložené (80BC22)
Z2upSalI	TTTTGTCGACATGTACATTGAAAGA	Přímý primer Zika NS2 (všechny varianty)
ZDwnNS2KpnIXhoIus eBamH	TTTGGATCCTTTCTCGAGGGTACCCACCGCCCCGCCATGGGTGGACC	Zpětný primer Zika NS2 hydrofilní (35GF91, 35GI53, 85GA17)
ZUpNS3KpnIuseXhoI	TTTCTCGAGGGTACCGGGAGTGGAGGAGGAGGAAGTGGTGCCCTCTGG	Přímý primer Zika NS3 pro kovaletní dimer (35GF91)
ZUpNS3KpnIuseXhoITEV	TTTCTCGAGGGTACCGGGGAGAACCTGTATTTTCAGAGTGGTGCCCTC	Přímý primer Zika NS3 pro TEV štěpné místo (85GA17)
Zns3UpXhoIKpnINatu	TTTCTCGAGGGTACCGGGAGTACCGGCAAACGCAGTGGTGCCCTCTGG	Přímý primer Zika NS3 pro přirození štěpné místo (35GI53)
DwnZ3PRBamH	TTTGGATCCTATTACTTCTTCTTCAGCATCG	Zpětný primer Zika NS3 proteasu (35GF91, 35GI53, 85GA17, 87BJ41, 80GG58, 80GG48, 86BJ62)
DwnZ3HelBamH	TTTGGATCCTATTATCTTTTTCAGCGGCG	Zpětný primer pro Zika NS3 helikasu (35GD25)
UpZ3PlusGBlunt	GCGGTGCCCTCTGGGACGTGCCTG	Přímý primer pro Zika NS3 pro 80GG48
UpZ3AtoGBlunt	GCCTCTGGGACGTGCCTGC	Přímý primer pro Zika NS3 pro 87BJ41
DwnZNS2XhoI	TTTCTCGAGCACATACCACGCTCCTGCAGC	Zpětný primer ZikaNS2 pro 80GG58, vektor 80GG48
ZhelSek	ACCGGGTCATAGACTCTAGG	Primer k sekvenaci Zika i Dengue helikasy
T7 ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Zpětný primer k sekvenaci vloženého úseku (od proteasy)
pT7	TAATACGACTCACTATAGG	Přímý primer k sekvenaci vloženého úseku (od afinitní kotvy)

## Příloha 2: Srovnání sekvencí použitých fúzních proteinů

Použity jsou zkratky z tabulky 2 obsažené v práci. Tato zkratka je doplněna jedním ze sekvenčních čísel, dle kterého lze případnou variantu dohledat. Srovnání sekvencí bylo provedeno webovou aplikací Clustal Omega.

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

### Zika

```
KD 35GF91          DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPM-----
Hfil 35GI53        DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPM-----
TEVfil 85GA17      DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPM-----
TEVfob I 87BJ41    DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREIILKVVLMMAICGM
TEVfob II 80GG58   DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREIILKVVLMMAICGM
TEVfob III 80GG48 DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREIILKVVLMMAICGM
Hfob 86BJ62        DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREIILKVVLMMAICGM
Helicase 35GD25    DMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEEDGPPMREIILKVVLMMAICGM
*****

KD 35GF91          -----AGGGGSGGGGSGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
Hfil 35GI53        -----AGGGGSTGKRSGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
TEVfil 85GA17      -----AGGGENLYFQSGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQAG
TEVfob I 87BJ41    NPIAIPFAAGAWYVYVLENLYFQG--LWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
TEVfob II 80GG58   NPIAIPFAAGAWYV--LENLYFQGGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
TEVfob III 80GG48 NPIAIPFAAGAWYVYVLENLYFQGGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
Hfob 86BJ62        NPIAIPFAAGAWYVYV--KTGKRSGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
Helicase 35GD25    NPIAIPFAAGAWYVYV--KTGKRSGALWDVPAPKEVKKGTTDGVYRVMTRLLGSTQVG
*****

KD 35GF91          VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
Hfil 35GI53        VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
TEVfil 85GA17      VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
TEVfob I 87BJ41    VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
TEVfob II 80GG58   VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
TEVfob III 80GG48 VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
Hfob 86BJ62        VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
Helicase 35GD25    VGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRLDPYWGDVKQDLVSYCGPWKLDATWDGVSEVQL
*****

KD 35GF91          LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
Hfil 35GI53        LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
TEVfil 85GA17      LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
TEVfob I 87BJ41    LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
TEVfob II 80GG58   LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
TEVfob III 80GG48 LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
Hfob 86BJ62        LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
Helicase 35GD25    LAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYGNGVVIK
*****

KD 35GF91          NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
Hfil 35GI53        NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
TEVfil 85GA17      NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
TEVfob I 87BJ41    NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
TEVfob II 80GG58   NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
TEVfob III 80GG48 NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
Hfob 86BJ62        NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKK
Helicase 35GD25    NGSYVSAITQGKREETPVECFEPSMLKKKQLTVLDLHPGAGKTRRVLPEIVREAIAKKRL
*****

Helicase 35GD25    RTVILAPTRVVAAMEEALRGLPVRymTTAVKVTHSGTEIVDLMCHATFTSRLQLPIRVP
NynlyIMDEAHFTDPSSIAARGYISTRVEMGEAAAFMTATPPGTRDAFPDSNSPIMDTE
VEVPERAWSSGFDWVTDHSGKTVWFVPSVRNGNEIAACLTAKGRVQLSRKTFETEFQK
TKNQEWDFVITTDISEMGANFKADRVIDSRRLKPVILDGERVILAGPMPVTHASAAQRR
GRIGRNPKNKPGDEYMYGGGCAETDEDHAHWLEARMMLLDNIYLDGLIASLYRPEADKVA
IEGEFKLRTEQRKTFVELMKRGDLPVWLAYQVASAGITYTDRRCWCFDGTNTNIMEDSV
AEVWTKYGEKRVLKPWRMDARVCSHAALKSFKEFAAGKR
```

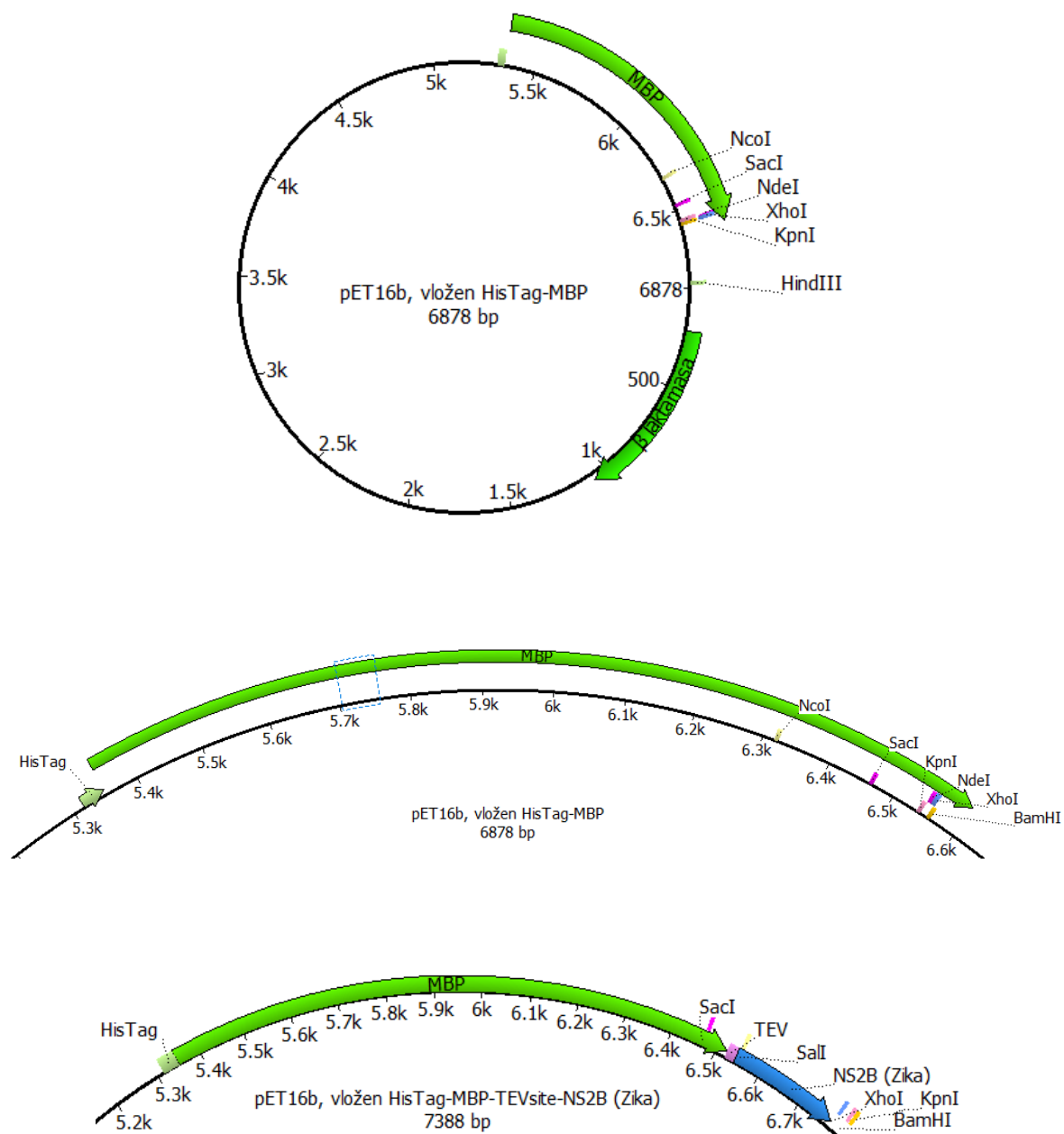
## Dengue

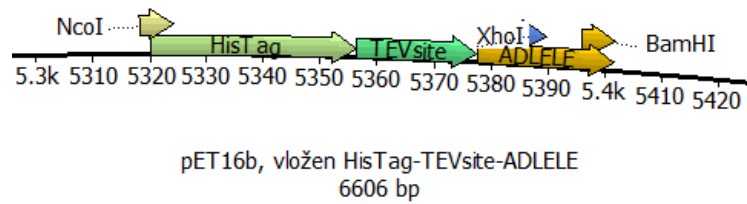
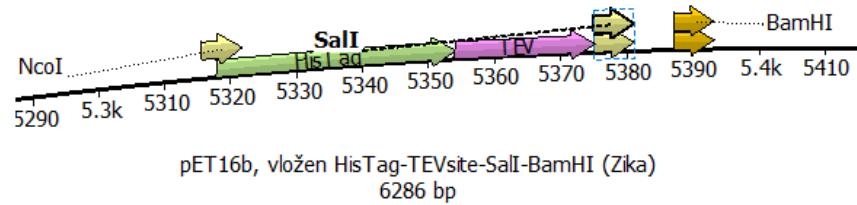
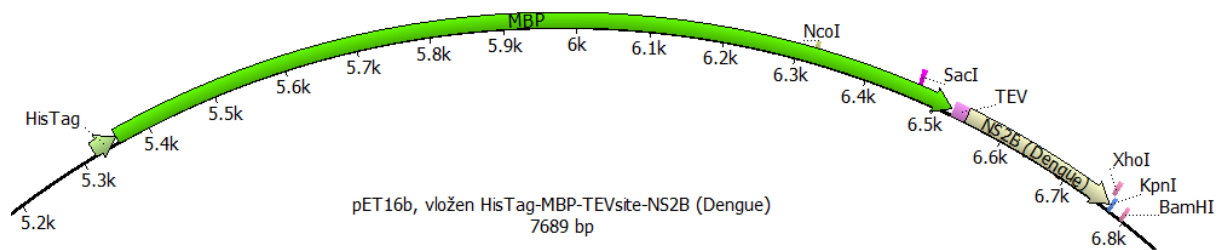
KD 35GH53	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTL-----
Hfil 35GI63	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTL-----
TEVfil 35GH16	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTL-----
TEVfob I 80BC25	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTLTILIRTGLLVISG
TEVfob II 80BC22	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTLTILIRTGLLVISG
Hfob 35GI24	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTLTILIRTGLLVISG
Helicase 85FD20	ADLELERAADVKKWEDQAEISGSSPILSITISEDGSMSEIKNEEEEQTLTILIRTGLLVISG
	*****
KD 35GH53	-----GGGGSGGGGAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
Hfil 35GI63	-----VKKQRAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
TEVfil 35GH16	-----GGENLYFQAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
TEVfob I 80BC25	LFPVSIPITAAAWYLLLENLYFQG-GVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
TEVfob II 80BC22	LFPVSIPITAAAWYLLLENLYFQGAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
Hfob 35GI24	LFPVSIPITAAAWYLWE-VKKQRAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
Helicase 85FD20	LFPVSIPITAAAWYLWE-VKKQRAGVLWDVPSPPPMGKAELEDGAYRIKQKGILGYSQIG
	*****
KD 35GH53	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
Hfil 35GI63	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
TEVfil 35GH16	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
TEVfob I 80BC25	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
TEVfob II 80BC22	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
Hfob 35GI24	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
Helicase 85FD20	AGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGWKEGEEVQV
	*****
KD 35GH53	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
Hfil 35GI63	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
TEVfil 35GH16	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
TEVfob I 80BC25	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
TEVfob II 80BC22	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
Hfob 35GI24	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
Helicase 85FD20	LALEPGKNPRAVQTKPGLFKNAGTIGAVSLDFSPGTSGSPIIDKKGKVVGLYGNVVTTR
	*****
KD 35GH53	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
Hfil 35GI63	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
TEVfil 35GH16	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
TEVfob I 80BC25	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
TEVfob II 80BC22	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
Hfob 35GI24	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRK
Helicase 85FD20	SGAYVSAIAQTEKSIEDNPEIEDDIFRKRLTIMDLHPGAGKTKRYLPAIVREAIKRGRLR
	*****
Helicase 85FD20	TLILAPTRVVAEWRTLILAPTRVVAEMEELRGLPIRYQTPAIRAEYTGREIVDLMCHATFT
MRL	LSPVRVPNYNLIIMDEAHFTDPASIAARGYISTRVEMGEAAGIFMTATPPGSRDPFPQSNAPII
	DEEREIPERSWNSGHEWVTFDKGKTWVFPVPSIKAGNDIAACLRKNGKKVIQLSRKTFDSEYVKT
	RTNDWDFVVTDDISEMGANFKAERVIDPRRCMKPVILTDGEERVILAGPMPVTHSSAAQRRGRI
	GRNPKNENDQYIYMGEPLENDEDCAHWKEAKMLLDNINTPEGIIPSMFEPEREKVDAIDGEYRL
	RGEARKTFVDLMRRGDLPVWLAYRVAAEGINYADRRWCFDGIKNNQILEENVEVEIWTKEGERK
	KLKPRWLDARIYSDDLALKEFKEFAAGRK

### Příloha 3: Mapy upravených plasmidů pET16b

V mapách jsou vyznačena použitá štepná místa a geny důležité pro klonování variant fúzních proteinů použitých v této práci. Plasmidy jsou popsány vždy pod výsečí včetně jejich celkové délky. Mapy plasmidů vytvořené pomocí Unipro Ugene

<http://ugene.net/>





Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

[illegible]